

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/25289 A1

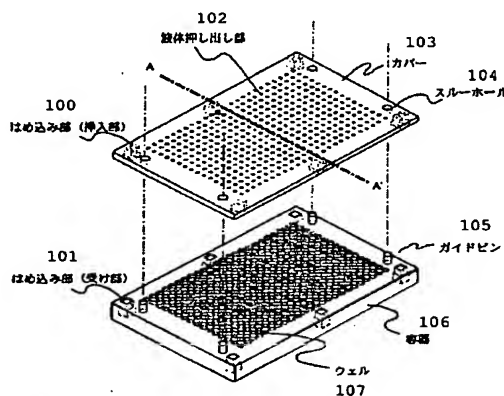
- (51) 国際特許分類: G01N 35/00,  
37/00, 33/48, C12M 1/00, C12Q 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08079
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 17 日 (17.09.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-281207 2000 年 9 月 18 日 (18.09.2000) JP  
特願2001-63801 2001 年 3 月 8 日 (08.03.2001) JP  
特願2001-195916 2001 年 6 月 28 日 (28.06.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.(CASTI)) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内ビルディング6階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木英之

- (SUZUKI, Hideyuki) [JP/JP]; 〒108-0071 東京都港区白金台3-16-29-101 Tokyo (JP). 中村祐輔 (NAKA-MURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒225-0011 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-17-33 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 園田吉隆, 外(SONODA, Yoshitaka et al.); 〒163-0243 東京都新宿区西新宿2丁目6番1号 新宿住友ビル43階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: MICRO WELL ARRAY AND METHOD OF SEALING LIQUID USING THE MICRO WELL ARRAY

(54) 発明の名称: マイクロウェルアレイと同マイクロウェルアレイを用いた液体の密封方法



(57) Abstract: A micro well array and a method of sealing liquid by using the micro well array; the micro well array, comprising a container having a plurality of independent wells disposed, therein, in array shape and a cover capable of covering the container, characterized in that the area of each well near the edge part thereof forms a projected part higher than the peripheral area thereof; the method, comprising the steps of injecting the liquid into the wells by an amount exceeding the volume of the wells after depositing to extrude the excess liquid from the wells so that air does not almost remain in the wells, whereby minute amount of specimen is allowed to react with reagent in a very small space and a fluorescence forming signals can be taken out efficiently.

- 100...ENGAGEMENT PART (INSERTING PART)  
101...ENGAGEMENT PART (RECEIVING PART)  
102...LIQUID EXTRUDING PART  
103...COVER  
104...THROUGH HOLE  
105...GUIDE PIN  
106...CONTAINER  
107...WELL

[続葉有]



## 添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 補正書・説明書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

溶着後のウェルの容積を超える量の液体をウェルにスポットし、その余分の液体をウェルから押し出して空気がウェル内にほとんど残存しないように液体を密閉することにより、微量の試料及び試薬を微小な空間で反応させ、信号となる蛍光を効率的に取り出すことができるマイクロウェルアレイ及びその密閉方法を提供する。複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、各々のウェルの縁部近傍は、周囲よりも高くなった隆起部を形成していることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

## 明細書

### マイクロウェルアレイと同マイクロウェルアレイを用いた液体の密閉方法

## 技術分野

本発明は、極微量の溶液を密閉させる場合に利用されるマイクロウェルアレイ、当該マイクロウェルアレイを使用した液体の密閉方法、当該マイクロウェルアレイへの液体の分注方法、当該マイクロアレイの製造方法、当該マイクロアレイ用の溶着装置、および、当該マイクロアレイを用いた解析方法に関する。

## 背景技術

多くの化合物の中から、選択的に必要な化合物を選り分ける場合に使用される技術の一つとして、HTS (High Throughput Screening、ハイスループットスクリーニング) 技術がある。HTS技術は、大量の生物学的情報を一度に取り扱うことができ、化学反応や蛍光の検出を試験管などで一回ずつ行うよりも、コスト・時間の点で圧倒的に有利であるために、近年特に注目されている技術である。

例えば、現在急速に普及しつつあるDNAマイクロアレイは、遺伝子発現解析を目的としているが、これもHTS技術から派生した技術であり、1枚のスライドガラスの表面に数千から数万のプロープcDNA (遺伝子) をスポットし、検体から取り出したmRNAを逆転写することにより得られたターゲットcDNAとハイブリダイゼーションを行わせることにより、遺伝子ごとの発現量を並列的に比較・処理することができる有力な解析手段である。

このDNAマイクロアレイでは、ターゲットとなるcDNAとプロープとなるcDNAをバッファー溶液中でハイブリダイゼーション反応させた後、スライドガラスを洗浄・乾燥し、各スポットから発せられる蛍光を光スキャナーで測定しているが、アッセイによっては、反応と信号の検出を溶液の状態で行わなければならない場合も多い。例えば、SNPタイピング (中村祐輔編集「SNP遺伝子多型の戦略」、p.93～p.149、中山書店、2000年6月発行) に用いられるTaqMan PCR法、Invader法、RCA法などではDNAと酵素との反応、及び反応

の結果得られる蛍光の検出を、溶液のままの状態で行わなければならない。

Invader 法は、原理が V. Lyamichev et al., "Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes", Nature Biotechnology 17 (1999) 292-296. に記載されているが、この方法を用いることにより、ゲノム DNA 中の多型を選択的に検出することができる。すなわち、実験方法として、ゲノム DNA 200 ng 程度を分注し、それに試薬 20  $\mu$ L ( 蛍光標識試薬+酵素+Invader プローブの混合液) を混合する。そして、溶液から発する蛍光強度を測定することにより、検出したい DNA の配列 (いわゆる多型) がゲノム DNA 中に存在するかどうかを判定 (タイピング) することができる。

現在、溶液の反応を大量に行う場合には、一つのウェル当り数十から数百  $\mu$ L の容積を持つ 96 ウェルマイクロタイタープレートあるいは 384 ウェルマイクロタイタープレートに反応試薬を分注し、サーマルサイクラーで熱処理するのが一般的である。加熱する際、液体が蒸発してウェルから出ていかないようにサンプルを保持しているウェルを密閉する必要があり、通常粘着剤の付いた可撓性のシートあるいはフィルムでウェルを覆っている。特に、DNA を変性する場合には、水の沸騰温度に近い 95  $^{\circ}$ C で加熱しなければならないため、シート (あるいはフィルム) にウェルの内側より大きな圧力がかかる。この時、蒸発した溶液をウェルから逃さないようにするために、ウェルを完全に密閉している。

こうした熱処理を伴うアッセイを効率的に行うために、96 ウェルマイクロタイタープレートあるいは 384 ウェルマイクロタイタープレートの材質、形状、化学的・物理的特性はこれまで用途に応じて種々の工夫がなされてきた。例えば、特表平 11-507508 には、マイクロプレートの各ウェルをシールする際、弾力圧縮性のリッジがパッドの表面に形成されている可撓性を有するパッドを、ウェルの開口部に押し当てることによって、ウェル内部を液密な状態に保持し、加熱・攪拌工程の後にパッドをウェルから剥がし易くすることを特徴とする発明が示されている。米国特許第 6106783 号は、各ウェルをシールする際のクロスコンタミネーションの低減を目的とした構成を開示するものである。

一方、特開平 10-221243 には、隣接ウェル間の光クロストークを減らすために不透明な材料でウェルの側壁を構成し、ウェルの上下方向から光の発光を計測できるよう底面部を透明性の高い材料で形成したマイクロプレートが開示されている。米国特許第 5487872 号は、ウェルの上下方向からの発光の計測を容易にするために、ウェルの底部を紫外線透過性の材料で



構成したマイクロタイタープレートを開示するものである。

### 発明の開示

反応に用いられる酵素（構造的にはたんぱく質）や反応生成物の検出に用いられる蛍光色素が非常に高価なこと、検体等から抽出できるゲノムDNAの量（20ccの血液から採取できるDNAは100～200 $\mu$ g）が限られていることから、これまで微量の検体からDNAの配列、疾患、遺伝などに関する多くの情報を引き出すことは難しかった。そのため、微量の溶液を狭い空間に密閉し、溶液から発せられた光信号を高感度に検出することによって、一つのウェル当りに必要な試薬や試料を極力少なくするアッセイが望まれている。

しかしながら、従来使われてきたマイクロタイタープレートのウェル容積をただ単に小さくしても、ウェルの密閉方法自体を根本的に変えなければ、恒温水槽中で長時間ウェル内の溶液をインキュベート（熱処理）したり、沸騰させたりすることはできない。このことは、たとえば水が95℃で沸騰して蒸気になると、常温（25℃）時の体積の約1600倍になるため、密閉したウェルの内部から、1600倍近くの圧力がかかることになり、従来のシール方法ではウェルの密閉性を維持することができないことから明らかである。

溶液を液密にシールする前者の発明により、サーマルサイクラーで熱処理している間の溶液の減少を最小限に抑えることができる。また、ウェルの底面部に透明性を持たせる後者の発明により、検出される蛍光の量を高めることが可能である。しかしながら、TaqMan 法や Invader 法などの溶液反応を行わせる場合には、これらの発明を利用しても、一つのウェルに数十 $\mu$ L～数百 $\mu$ L程度の溶液や数百 ng のゲノムDNAを依然として割り当てなければならない。またマイクロタイタープレートはウェルの容積が大きいために、ウェル内の蛍光試薬全体を光によって励起することが困難である。加えて、ウェルから発せられた蛍光は、容積の大きいウェルの側壁などで散乱されたり、底面部から透過して散逸するため、プレートリーダーなどを用いても、蛍光を高い収率で検出することができない。その結果、マイクロプレートを利用する限り、蛍光試薬・酵素・検体試料を大幅に削減し、並列的に大量のデータを取得することは難しい。

また近年、ICAN 法、Lamp 法など等温でDNAを増幅する技術が開発されているが、従来発明されたウェルのシール方法を使う限りにおいては、恒温水槽中で、長時間ウェルを液密に維持することが難しい。

このような実状のもとに本発明は創案されたものであって、その目的は、マイクロタイタープレートを使用した場合に、試薬の量が少なくとも  $5.0\mu\text{L}$  以上でなければ反応・検出できないと考えられてきた反応系を、数  $\mu\text{L}$  以下、場合によっては  $0.5\mu\text{L}$  以下の微量な溶液でも、空気をほとんど介在させないようにマイクロウェルに密閉し、かつ、ウェルを高密度に配置してアレイ化することによって、微量の検体試料を反応・検出して、並列的に処理し、大量の情報を引き出すことが出来るマイクロウェルアレイを提供することである。また、マイクロウェルアレイを構成する容器、カバーとしてプラスチック材料から成るものを使用することによって、低コストなマイクロウェルアレイを実現することが可能である。

本発明の1つの実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数のウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、各々のウェルの縁部近傍は、周囲よりも高くなった隆起部を形成している。この構成によれば、容器とカバーの密着性を容易に確保できるので微量な溶液の封入に好適である。また、容器とカバーを超音波振動によって溶着させる場合には、超音波振動が当該隆起部に集中し、容易に溶着することができるので好適である。このことは特に、ウェルに収容された液にDNAやタンパク質が含まれる場合、これらに損傷を与えることなく溶着を行うことが可能になるために特に好適である。さらに、容器にカバーを取り付けて密閉する際に、マイクロウェルから液があふれることが有っても、上記隆起部によって、あふれた液が隣接するマイクロウェルの内部に混入してクロスコンタミネーションが起きることが防止される。

本発明の他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数のウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、各々のウェルの縁部近傍は、周囲よりも高くなった溶着用隆起部を形成している。この構成によれば、容器とカバーを超音波振動によって溶着させる場合に、超音波振動が当該溶着されるべき隆起部に集中し、容易に溶着することができるので好適である。

本発明の他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数のウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、カバーには、カバーで容器を覆ったときに各ウェルの縁部近傍に対応する位置に、周囲よりも高くなった隆起部が形成されている。この構造の場合にも上述の構造と同様に、カバーに設けられた隆起部の存在によって、容器とカバーの密着性を容易に確保できるので微量な溶液の封入に好適である。また、超音波振動によって容器とカバーの溶着を行う際に、超音波エネルギーを当該部分に集中させることができるので特に

好適である。容器にカバーを密着させる際にウェル内の液が溢れることがあっても、容器とカバーの間に形成された空間に收容されるので上記動揺にクロスコンタミネーションを防止することができる。

本発明の他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数のウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、カバーには、カバーで容器を覆ったときに各ウェルの縁部近傍に対応する位置に、周囲よりも高くなった溶着用隆起部が形成されている。この構造の場合にも上述の構造と同様に、カバーに設けられた隆起部の存在によって、超音波振動によって容器とカバーの溶着を行う際に、超音波エネルギーを当該部分に集中させることができるので特に好適である。

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、前述のウェルの縁部近傍またはカバーに形成された隆起部は、例えば、円形、四角形等の環状、すなわち、ウェルの周囲を囲んだ形状になっており、その頂部が好ましくは凸面状であって、平面ではない。この構造は、容器とカバーとを密着させて超音波振動によって溶着させる場合、振動のエネルギーが集中する容器とカバーの接触部分の領域を小さくする効果があり、溶着が一層容易になるので好適である。

本発明の1つの側面によれば、複数のウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、容器の、各々のウェルの周囲またはカバーの当該ウェルの周囲に対応する位置の少なくとも一方には、ウェルをカバーによって覆った際にウェルから溢れた液を收容することができる溝が形成されていることを特徴とするマイクロウェルアレイが提供される。マイクロウェルに検体試料を注入して密閉する際に、同時に空気が閉じこめられないようにするためには、マイクロウェルから余剰の検体試料があふれ出ることが起こりえるが、上記の構成によれば、ウェルからあふれた液を容器のウェルの周囲に設けられた溝で受け止めることが出来るので、隣接するウェルの液と混合されてクロスコンタミネーションを生じることが排除される。当該構成は、特に容器とカバーが薄型で、これらを組み合わせた状態での厚さも薄い場合に特に有効である。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該カバーと液体の入った該ウェルとがウェルごとに溶着されている。容器とカバーとを溶着することによって、接着剤等が不要になるために溶剤の溶出等の問題を生じることがなく、接着部分にも容器とカバーが一体構造である場合と同等の強度が得られ、さらに、接着前の容器とカバーの取り扱いが容易にな

る等の効果がある。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該カバーと液体の入った該ウェルとがウェルごとに超音波溶着されている。容器とカバーとを超音波によって溶着することによって、マイクロ植えるあれ以前体の温度を上昇させることなく、つまり溶着部分のみのを局部的に昇温し、て数秒以内に液密な接合が実現できるため、低コストになり、しかも作業性及び生産性が飛躍的に向上する。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該容器と該カバーの実質的な厚みがいずれも、該容器と該カバーに接触する液体の熱を伝導することができる厚さである。ここで「実質的な厚み」とは、スカート部などを含まないウェルを定義する壁面を構成するカバーの厚みあるいは容器の厚みを指す。この構成によれば、恒温槽中にマイクロウェルアレイを浸漬した際に、周囲の液体からウェル内部に効率的に熱エネルギーが伝播される厚みを持たせることにより、インキュベーションを効果的に行うことができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該カバーと該容器の実質的な厚みがいずれも 0.15~3.0mm の範囲である。この厚みを 0.15~3.0mm の範囲にすることによって、水槽やサーマルサイクラーの熱を効果的にウェル内部に伝導させると共に、取り扱う際に破損させないだけの十分な強度を持たせることができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した状態でのマイクロウェルアレイの実質的な厚みが 0.3~4.0mm の範囲である。ここで「実質的な厚み」とは、スカート部などを含まないウェル近傍におけるカバーの上面から容器の下面までの厚さを指す。この厚みを 0.3~4.0mm の範囲にすることによって、カバーと容器を溶着した後に、熱を効果的にウェル内部に伝えることができると共に、取り扱う際に破損させないだけの十分な強度を持たせることができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した後のウェルをを直接定義する部分の厚さが、0.05~0.4mmの範囲である。このような構成によって、仮に他の部分の肉厚が厚くても、この0.05~0.4mmの範囲内の肉厚を持つ個所から熱を効果的にウェル内部に伝えることができ、化学反応を行わせる際に有効である。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該ウェル近傍には、該ウェルと該カバーを溶着するのに必要な体積を有する溶接用リブが設けられている。このようにリブの断面を、溶着後の強度を確保するために十分に大きな断面積を有するように設定することにより、ウェルごとの密閉性を維持することが可能となる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該ウェル近傍には、断面形状が三角形状の溶接用リブが設けられている。リブの底辺、すなわち、溶着前のリブの幅を上記範囲に設定することにより、超音波装置の出力に対する負担を低減でき、過負荷にならないような安定した条件で溶着することができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該ウェル周囲の溶着用リブの底辺の肉厚が0.2~1.0mmの範囲である。リブの底辺、すなわち、溶着前のリブの幅を上記範囲に設定することにより、超音波装置の出力に対する負担を低減でき、過負荷にならないような安定した条件で溶着することができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、ウェル周囲の溶着用リブの底辺の肉厚が0.2~1.0mmの範囲、高さが0.2~0.8mmの範囲、ウェルを取り囲むリブの直径が0.5~4.0mmの範囲である。この構成によれば、超音波装置の出力に対する負担を低減でき、高さとしリブの直径を上記範囲に設定することによって、リブの高さバラツキを吸収し、しかも溶着に負担がかからないようにすることができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に接合した状態でのウェルを取り囲む溶着部分の幅、すなわちドーナツ状に溶けた部分の幅が、0.3~2.5mmの範囲である。この構成によれば、溶着後にウェル内部の液体が沸騰しても、該カバーと該ウェルの密閉性を十分に維持することができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該マイクロウェルアレイが恒温槽中に浸漬された際、該ウェル内の液体温度が数分以内に均一になるような容積を該ウェルが有する。熱が効果的に、かつ均一に伝わる容積にすることによって、ウェル内での化学反応を効率的に行うことができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルの容積が0.1~1.4 $\mu$ lになることを特徴とするマイクロウェルアレイ。本発明の別の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に接合した後のウェルの容積が0.1~1.4 $\mu$ lになる。ウェルの容積を当該範囲にすることによって、ウェルの容積を測定限界にまで低減して多量なサンプルの取り扱いを可能にすることができる。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した後では、ウェル内部で液体が沸騰しても、ウェルの密閉性を保持することができる。本発明によって実現されるこの強固な密閉性は、接着剤等を使用した従来の密閉方法では実現することのできなかった強度を有するものである。このために、マイクロウェルアレイを、機械的な密閉補助手段なしで、直接高温処理することが可能になった。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、超音波を照射することにより該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した後では、ウェル内部で液体が沸騰しても、ウェルの密閉性が保持されている。すなわち、上記の密閉性は、この実施例においては、容器とカバーを超音波で溶着することによって実現されるものである。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルが

アレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した後のウェル内部で液体が沸騰しても、外部から密閉性を保持するための機械的な力を加えることなくウェルの密閉性が維持できる。すなわち、従来のマイクロウェルアレイは、大気圧下において、ある程度の密閉が可能ではあったが、ウェル部の液体が沸騰するような環境下では密閉が破れていたところ、本発明のマイクロウェルアレイでは、シール構造の改良によってウェル自体がこの内圧に耐えることができる構造を有するものである。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに接合した後のウェル内部で、90～100℃に加熱された液体が沸騰しても、ウェルごとの密閉性が保持される。すなわち、上記においてウェル内部の液体が沸騰する温度とは、具体的には例えば、90～100℃であり、本発明のマイクロウェルアレイはこの温度におけるウェル内の液体の沸騰圧力を保持することができるものである。

本発明の他の好ましい実施形態によれば、マイクロウェルアレイは、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに接合した後に、該マイクロウェルアレイを沸騰した水溶液中に浸漬させても、ウェルごとの密閉性が保持される。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイにはさらに、ほぼ平板状で可撓性を有する材料からなる中間体を容器とカバーの間に介在させてある。当該構造のマイクロアレイの場合には、カバーを容器に押し付けて密封を図る際、中間体が可撓性を有するので、中間体をマイクロウェルの上部に容易に密着させることができる。また、中間体がマイクロウェルの上縁部に接触して変形することにより、マイクロウェル内部の空気を排出するよう作用するので、好適である。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイにはさらに、前記カバーの、カバーで容器を覆ったときに各ウェルに対応する位置には、ウェルをカバーによって封止した際に、各ウェル内に押し込まれる凸部が形成されている。当該構造を有するマイクロウェルの場合には、カバーを容器に押し当てた際に、前記凸部が各ウェルの中に押し込まれることによって、ウェル内に存在する可能性のある気泡を、場合によっては液とともに、ウェルの外に排出することができるので好適である。

本発明の他の実施形態によれば、カバーまたは中間体を容器に押し付けた後、カバーと容器を

溶接することにより各ウェルに液体を封止する方法が提供される。当該方法によれば、密封動作と溶着による封止動作を同時に実施することができるために作業効率が向上し、さらに、接着剤を使用しないためにウェル内の液の汚染を防止することができる。

本発明の他の実施形態によれば、上記の各ウェルに封止される液体はDNAまたはタンパク質を含む液である。この場合には、容器とカバーとが溶接されているので当該液が外気に触れることなく確実に密封され、また、密封された以降の取り扱いが簡便である。

本発明のさらに他の実施形態によれば、ウェルにDNAまたはタンパク質を含む液を封止したマイクロウェルアレイは、容器とカバーが超音波によって溶着されたものである。超音波振動によって振動エネルギーを溶着部分に集中させることによって、DNAまたはタンパク質に損傷を与えずに封止が可能なので、DNAまたはタンパク質の有効性を損なうことなく密封することができる。

本発明のさらに他の好適な実施形態によれば、容器とカバーを溶着させる際の超音波照射は、溶着に十分であって同時にDNAまたはタンパク質を実質的に損傷させないものの中から選択される。本明細書において、DNAまたはタンパク質を実質的に損傷させないとは、少なくとも以降の解析が可能な程度のDNAまたはタンパク質がウェルに残存していることを意味する。超音波の照射エネルギー等を上記の範囲から適宜選択することによって、解析に最も好適な封止を可能にする密閉方法を得ることができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、該容器のウェルと該カバーを、0.05秒から0.8秒の間、超音波を照射することで溶着し、液密に封止する。当該条件の下で超音波溶着を行うことによって、確実な密封を図ると同時に、超音波エネルギーを小さくすることができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、溶融する隆起部の長さ1cmあたり、0.3ないし100Nの力を加えつつ、超音波ホーンの振動を開始する。当該条件の下で超音波溶着を行うことによって、確実な密封を図ると同時に、超音波エネルギーを小さくすることができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの容器とカバーとが各ウェルごとに超音波溶着によって容易にウェルの封止を行うことができる材料からなる。当該構成によれば、ウェル内に収容された検体試料に影響を与えることなく、容器とカバーとの超音波溶着を容易に行うことができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイはさらに、各ウェルの裏面が平面状である特徴を有する。当該構造であれば平らなヒートブロックの上にマイクロウェルアレイ



を配置し、加熱することができる。また、複数のマイクロウェルアレイを重ね置くことができ、さらに成形が容易である特徴を有する。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイのウェルの内壁面またはカバーの下面に、光を反射する反射面が設けられている。当該構成によれば、反射面を背景として蛍光等の測定を行えば、測定される傾向の量が増量されるので、測定感度を実質的に向上させることができる。さらに、ウェルの内壁面を反射面とした場合は、隣接するウェル方向への蛍光の漏れを防止する効果も有するので、クロストークを低減することができる。

本発明のさらに別の側面によれば、前述のマイクロウェルアレイを用い、先に接触式の分注機により液体を分注し、その後非接触式の分注機により液体を分注する分注方法が提供される。当該方法によれば、接触式の分注機による高速分注と非接触式の分注機によるクロスコンタミネーションのない分注の長所をともに生かすことができる。

本発明の他の実施形態によれば、先に接触式の分注機によりウェルごとに異なる液体を分注し、その後非接触式の分注機により液体を分注する。当該方法によれば、後に分注する液体は非接触式の分注を用いて分注するので、クロスコンタミネーションが生じることがない。

本発明のさらに他の実施形態によれば、先に接触式の分注機により液体を分注し、その液体を乾燥させ、その後非接触式の分注機により液体を分注する。当該方法によれば、異なる液を複数回分注してもコンタミネーションを生じることがない。さらに、後に分注する液体は非接触式の分注を用いて分注するので、クロスコンタミネーションが生じることがない。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの各ウェルの水平断面は円形である。当該構造の場合には、ウェルの内壁面に気泡が付着する可能性が低く、また、上面を超音波溶着封止する際に振動エネルギーが均一に分布するために照射すべき振動エネルギーが少なくなる利点がある。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの外周部に沿ってスカート部が形成されている。当該構成によって、マイクロウェルアレイの外形を概ね直方体、または、平板上とすることができ、重ね置く場合等において取り扱いが一層容易になる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイに形成されたスカート部の角に、貫通穴が形成されている。当該構成においては、液の注入や蛍光の測定時に、スカート部に形成された貫通孔を標準位置として位置あわせすることで位置合わせが容易になる利点がある。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの容器とカバーには挿入部と受

け部が形成され、挿入部を受け部にはめ込むことによって該容器と該カバーを係止することができる。当該構成によれば、カバーと容器の固定が容易に行われるだけでなく、両者の位置合わせも容易である。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの前記容器及び前記カバーがプラスチック材料から形成されている。当該構成によれば、一体成形によってマイクロウェルアレイの製造原価を低減することができ、さらに、超音波による溶着とも整合的である。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの容器とカバーが、メチルペンテンコポリマーあるいはポリカーボネートから構成されることで、前記一体成形と超音波による溶着の可能性を有するだけでなく、透明度が高いために蛍光の測定を効率的に行うことができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、マイクロウェルアレイの容器とカバーの少なくとも一方が、光学的に透明な材料で形成されている。当該構成によれば、蛍光の測定を効率的に行うことができる。

本発明の他の実施形態によれば、前述のマイクロウェルアレイを構成する、前記容器のウェルあるいは前記カバーの表面に、液状の試薬または検体を分注し、担持させる。このような構成によって、それぞれのウェルに収容される試薬又は検体あるいはそれらの組み合わせを独立に制御することができる。

本発明の他の実施形態によれば、試薬又は検体の分注は非接触式の分注機によりおこなう。このことによって、ウェル間の試薬又は検体のクロスコンタミネーションの可能性を一層低減することができる。

本発明の他の実施形態によれば、試薬または検体の少なくとも一方を前記容器のウェルに担持し、他の一方をカバー表面に担持し、前記ウェルと前記カバーを超音波溶着して接合し、各ウェルごとに試薬と検体を反応させる。この方法によって、試薬と検体とは超音波溶着の際に初めて互いに接触することになるために、混合前には個別に保持することが望ましい試薬と検体との組み合わせ等の場合には極めて好適である。また、この方法によれば、接触式の分注機のみで分注を実施することができ、クロスコンタミネーションの可能性も低減できる。

本発明の別の側面によれば、マイクロウェルアレイは、サイドゲートから樹脂を流し込んで該容器と該カバーを射出成形することによって製造される。当該製造方法は、本発明に基づくマイクロウェルアレイに必要な、製作精度および平坦度を実現するためには好ましい方法である。

本発明の別の側面によれば、前記容器とカバーの超音波溶着を実施するための超音波溶着装置

は、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、かつ、最大発振出力が4.1～5.0kWである。容器とカバーが接触する、ウェルの周囲の突起部分を震動によって溶かして溶着するためには、従来の超音波溶着装置の能力を超えた上記の能力が必要である。

本発明の超音波溶着装置の他の実施例では、ホーンの振幅が30～40ミクロン、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、かつ、最大発振出力が4.1～5.0kWである。このような特性を有するホーンを使用することによって、マイクロウェルアレイに対して、本発明が目的とする容器とカバーとの強固な密閉を実現することができる。

本発明の超音波溶着装置の他の実施例では、ホーンの振幅が30～40ミクロン、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、最大発振出力が4.1～5.0kW、溶着時間が0.05～0.8秒の時間内で超音波を照射することができる。ホーンは容器とカバーの溶着に必要な超音波振動エネルギーを照射できると同時に、測定対象の分子を破壊しないことが求められるが、上記の条件のホーンによって当該要件が満足される。

本発明の超音波溶着装置の他の実施例では、ホーンの振幅が30～40ミクロン、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、かつ、最大発振出力が4.1～5.0kWであり、0.05～0.8秒の時間内でウェルごとに溶着することができる。当該超音波溶着装置によれば、超音波振動エネルギーを各ウェルに分散して、各ウェルを溶着することができる。

本発明の他の側面によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に、分注機により分注し、その後超音波溶着装置により該カバーと該ウェルをウェルごとに液密に溶着することを特徴とする密閉・分注方法が提案される。当該密閉・溶着方法を実施することによって、各ウェルに収容された試薬又は検体を、クロスコンタミネーションの可能性を最小限にして、強固に密封することができる。

本発明の他の側面によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に、分注機により分注し、その後超音波溶着装置により該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、蛍光評価装置によりウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとの反応の度合いを解析することを特徴とする解析方法が提案される。当該方法によって、ごく微量の試薬又は検体を

もちいて、反応の度合いを高精度に解析することができる。

本発明の他の側面によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に、分注機により分注し、その後超音波溶着装置により該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、蛍光評価装置によりウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとに遺伝子を解析することを特徴とする遺伝子の解析方法が提供される。当該方法によって、ごく微量の試薬又は検体をもちいて、遺伝子解析を高精度に実施することができる。

本発明の他の側面によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に、分注機により分注し、その後超音波溶着装置により該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、蛍光評価装置によりウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとに遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の多型解析方法が提供される。当該方法によって、ごく微量の試薬又は検体をもちいて、遺伝子の多型解析を高精度に実施することができる。

本発明の他の好適な実施例によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該ウェルにそれぞれ異なる DNA を分注し、次に試薬を複数の該ウェルに分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする遺伝子の多型解析方法が提供される。当該解析手法を使用することにより、ごく微量な溶液の状態における蛍光強度分析を通じて容易に遺伝子の多型解析を行うことができる。

本発明の他の好適な実施例によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、複数の該ウェルに試薬を分注し、次に該ウェルにそれぞれ異なる DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする遺伝子の多型解析方法が提供される。当該解析手法を使用することにより、ごく微量な溶液の状態における蛍光強度分析を通じて容易に遺伝子の多型解析を行うことができる。

本発明の他の好適な実施例によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該カバー表面に試薬を分注し、次に該ウェルにそれぞれ異なる DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする遺伝子の多型解析方法が提供される。当該解析手法を使用することにより、ごく微量な溶液の状態における蛍光強度分析を通じて容易に遺伝子の多型解析を行うことができる。

本発明の他の好適な実施例によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該カバー表面にそれぞれ異なる試薬を分注し、次に該ウェルに DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の診断方法が提供される。当該解析手法を使用することにより、ごく微量な溶液の状態における蛍光強度分析を通じて容易に遺伝子の診断を行うことができる。

本発明の他の好適な実施例によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該ウェルにそれぞれ異なる試薬を分注し、次に該ウェルに DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の診断方法が提供される。当該解析手法を使用することにより、ごく微量な溶液の状態における蛍光強度分析を通じて容易に遺伝子の診断を行うことができる。

本発明の他の側面によれば、複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、そのマイクロウェルアレイに分注する試薬及び検体に対応したバーコードを添付して、工程ごとに、また、マイクロウェルアレイごとに進捗をバーコードで管理できるようにし、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に、分注機により分注し、その後超音波溶着装置により該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、蛍光評価装置によりウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとの反応の度合いを解析することを特徴とする解析方法が提供される。本方法によれば、多数又は多種類の試薬等を使用した解析を行う際のデータの取り扱いをより簡便にし、錯誤によるミスの可能性を低減することができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、前記容器あるいは前記カバーの少なくとも一方は、再

度ゲートから樹脂を流し込んで射出成形することによって製造される。当該製造方法を採用することにより、容器あるいはカバーの厚さが小さくなった場合にもそののりない平坦度の高いものを得ることができる。

本発明の他の側面によれば、上述のようなマイクロウェルアレイを用い、各ウェルに液体を分注し、液体をウェルから押し出すように前記カバーまたは前記中間体を容器に押し付けることによって、該ウェル内への空気の混入を防ぐように各ウェルに液体を封止することを特徴とする液体の密閉方法が提供される。当該方法によって液体を密閉することによって、空気のウェルへの混入を排除することができ、後の昇温処理において空気の膨張によるウェル内の内圧膨張を防止することができる。

本発明のさらに他の実施形態によれば、前記溶接は超音波溶着によって行う。超音波溶着によって、ウェルに収容された検体試料に対する汚染等の影響を最も小さくしつつ、ウェルの密封を実施することができる。特に、容器とカバーが接触する部分、つまり、ウェルの縁部またはカバーの接触部分の形状を適宜選択することによって超音波溶着に必要なエネルギーを低減することが可能で、液への影響は実質的に無視することができる程度に抑えることができる。

上記は本発明が提供する解決手段とその効果を例示したものであって、上記の解決手段の上記以外の効果、本発明が提供する上記以外の解決手段とそれらによって得られる効果は、以下の発明の実施の形態の記載に基づいて当業者は容易に理解するはずである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明のマイクロウェルアレイを説明するための斜視図である。

図2は、本発明のマイクロウェルアレイを説明するための断面図である。

図3は、本発明の別のマイクロウェルアレイを説明するための断面図である。

図4は、本発明のはめ込み部を説明するための断面図である。

図5は、本発明の液体逃げ溝を説明するための断面図である。

図6は、本発明の液体逃げ溝を説明するための断面図である。

図7は、本発明の反射体を配置する方法を説明するための図面である。

図8は、本発明のスカート部、ゲート位置、貫通穴を配置する方法を説明するための図面である。

図 9 は、本発明の液体の密閉方法を説明するための図面である。

図 10 は、本発明の別の液体の密閉方法を説明するための図面である。

図 11 は、本発明の分注方法を説明するための図面である。

図 12 は、超音波溶着の時間と反応性の関係を説明するための図面である。

図 13 は、発振時の力と残存する液量の関係を説明するための図面である。

図 14 は、本発明の遺伝子解析方法を説明するための図面である。

図 15 は、本発明の別のマイクロウェルアレイを説明するための斜視図である。

図 16 は、本発明のマイクロウェルアレイを説明するための断面図である。

図 17 は、本発明の別の液体の密閉方法を説明するための図面である。

図 18 は、本発明の接着剤用凹部と超音波溶着用隆起部を説明するための図面である。

図 19 は、本発明の接着剤用凹部あるいは超音波溶着用隆起部を説明するための図面である。

図 20 は、本発明のはめ込み部と超音波溶着用隆起部を説明するための図面である。

図 21 は、本発明の別の液体の密閉方法を説明するための図面である。

図 22 は、本発明の別の液体の密閉方法を説明するための図面である。

図 23 は、本発明の別の液体の密閉方法を説明するための図面である。

図 24 は、本発明のタイピング方法と遺伝子診断方法を説明するための図面である。

図 25 は、384 個のマイクロウェルを形成し、マイクロウェル相互間に溝を形成した本発明のマイクロウェルアレイの 1 実施例の斜視図である。

図 26 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイの 1 つの実施例を上から見た様子を示す図面である。

図 27 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイの側面図である。

図 28 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイの他の側面図である。

図 29 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイをしたからみた底面図である。

図 30 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイの図中 A A で示す部分の断面図である。

図 31 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイの図中 B B で示す部分の断面図である。

図 32 は、図 30 において C C で示した部分の拡大断面図である。

図 33 は、図 25 に示したマイクロウェルアレイの蓋の下面を示す図面である。

図 34 は、図 33 に示す蓋を側方から見た様子を示す側面図である。

図 35 は、384 個のマイクロウェルを形成し、溝のない本発明の 1 実施例を示す斜視図であ

る。

図36は、図35に示したマイクロウェルアレイの1つの実施例を上から見た様子を示す図面である。

図37は、図36に示すマイクロウェルアレイの部分拡大断面図である。

図38は、96個のマイクロウェルを形成した本発明の1つの実施例のマイクロウェルアレイの斜視図である。

図39は、極めて多数のマイクロウェルを形成した本発明の1つの実施例のマイクロウェルアレイの斜視図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の好適な実施の形態を図面を参照しつつ説明する。

これまで超音波はDNAや細胞を破壊する目的で使用されてきている。たとえば、ゲノムDNAを超音波によって破碎し、短い断片を形成した上で、塩基配列をシーケンサーで読みとるショットガン法がそのよい例である。また、細胞に超音波を印加することにより、細胞膜を破壊することも試みられてきた。しかしながら、本発明で考案されたように、容器の構造や超音波による溶接条件を工夫することにより、これまで破壊目的に使用されてきた超音波技術を、微量溶液やDNA、たんぱく質の封止に利用できることが明らかとなり、従来では考えられなかった応用を実現したという意味において、本発明の意義は非常に大きい。

図1は本発明のマイクロウェルアレイの斜視図である。この例では、384個の独立したウェルがプラスチック容器の表面に、縦横の間隔が4.5mmになるように形成されている。ここで「独立した」とは、別々のウェルに入っている液体が混合することなく、完全に分離されている状態を指している。カバーを上方からウェルに向けて押し付けることにより、ウェルに充填された微量の液体を空気がほとんど混入しないように、液密に密閉することができる。またカバーと容器の位置を確実に一致させるために四隅にスルーホールとガイドピンを設けており、押し付けた時にカバーと容器を簡便に接合するため、図のようにはめ込み部を形成した。図2は図1のA-A'に沿っての断面図であり、図のようにウェルは、ウェルの開口部、隆起部、液体の逃げ溝から構成されている。ここで隆起部はカバーと容器を溶接する際に溶融し接着する部分である。一般に、プラスチック材料どうし、あるいはほかの材料との接着には溶接、溶剤、接着剤によ



る方法がある。溶接は、プラスチックなどを加熱溶融させて接着する方法で、外部加熱式（ガスボットジェット、ヒートシール、赤外線、インパルスシール法など）と内部加熱式（高周波ウェルダー、ミシン、マイクロ波、超音波シール法など）がある。また振動により溶着する振動溶着法も溶接に含まれる。本発明の好適な実施例ではカバーと容器を超音波ウェルダーにより超音波溶着するが、振動溶着、溶剤や接着剤を併用することももちろん可能である。

ウェルの垂直断面形状は、微量の液体を分注するスポッティング装置のニードル（針）を入れ易くするため、台形の形状にした。高密度にウェルを配置する際（例えば9600ウェル）には、台形にするだけのスペースが確保できない場合もあり、断面形状は長方形でも構わない。従って、ウェルの密度とニードルのサイズ・形状によって、三角形、四角形などの多角形や、半円形など、最適な断面形状を決めることが必要である。

液体押し出し部（凸部）は、ウェルに充填された液体を逃げ溝に押し出し、ウェルに空気が残存しないようにするためのものであるが、ウェルに満たされる液体がウェルの開口部からはみ出て表面張力により盛り上がっている場合には、液体押し出し部を形成しなくても、空気が残存しないように液体を密閉することが可能である。仮に空気がウェル内に多量に残り、密閉した後もウェル内に空孔が存在すると、光が乱反射するだけでなく、光を発する溶液自体の量が減り、その結果として溶液から出射される蛍光の光量が低下する。また、空孔が残存しているウェルと残存していないウェルの間で蛍光強度が大きく異なると、ウェル間で信号がばらつく原因となり、定量的な解析ばかりでなく、定性的な解析も難しくなる。従って、ウェル内にできる限り気泡が残らないように溶液を密閉することが大切である。

この液体押し出し部は、溶着時に溶融した隆起部がウェルの上方を遮らないようにする作用も、上記機能に加えて持ち合わせている。すなわち、隆起部が溶融する際、隆起部を構成する樹脂が溶け出し、容器とカバーの間に広がるが、この液体押し出し部を形成することにより、溶け出した樹脂が、ウェル上方を覆うことを防止することができ、光の透過性を維持する上で、非常に有効である。

またこの例では、超音波のエネルギーを集中させるための隆起部が容器の表面に形成されているが、カバーの表面に設けられていても同様な効果が期待できる。図3は他の好適なウェル周囲の垂直断面形状の例を示す。図3（A）は、ウェル周囲に形成された隆起部の裾野が、ウェルの一部と繋がっている場合を示す。このような状態においては、溶着時に溶けた隆起部の一部がウェルに溶け出し、ウェルの容積を小さくしてしまうだけでなく、溶け出ることにより、ウェル内の

液体を加熱する場合がある。さらにウェル内の液体が、隆起部に蓄積されるはずの摩擦熱の一部を吸収し、カバーとウェルが溶着しにくくなる場合もある。従って、ウェル周囲の隆起部頂部の形状は、図3 (B) ~ (H) のように凸面状であることがより好ましい。

また、図4にはめ込み部の断面形状を示した。図4のようにプラスチックをフック状の形状を持つように加工することにより、フックの部分を内側に折り曲げるようにしてカバーを容器にはめ込むことができる。

上記液体の逃げ溝は、ウェルの開口部を囲むように周囲に形成してあるが、ウェルから押し出された液体が溜まる溝であれば、その形状や位置は限定されるものではない。例えば、図5の平面図に示すように、ウェルの列と列との間に直線状に逃げ溝を形成しても良いし、図6のように4個のウェルに囲まれた位置に形成しても良い。また、カバーの表面に設けられていても同様な効果が期待できる。

上記例では、ウェルの外形を円形にし、超音波のエネルギーが均等に印加されるように設計したが、外形は四角や三角などの多角形やその他の形状でも密閉できる構造になっていればもちろん構わない。

ここでカバーと容器は一般的な射出成形の方法で形成することができる。材料としては、耐薬品性、耐熱性に優れたポリカーボネート (PC)、ポリプロピレン (PP)、ポリスチレン、メチルペンテンコポリマー (TPX) などのプラスチック材料が挙げられ、特に紫外・可視・赤外光領域など、利用する波長領域で光の透明性の高いメチルペンテンコポリマーやポリカーボネートが適しているが、ポリカーボネートは材料費がポリプロピレンの4倍近くになる。メチルペンテンコポリマーはポリカーボネートと比較すると柔らかく、材料費も高いが、樹脂の流動性が良いため、射出成形の際、肉厚の薄い成形品を作りやすいという長所を有している。従って、求められる特性とコストに応じて、材料を選択することが重要である。

容器の表面に形成されたウェルとカバーは溶接により接着するが、各ウェルを液密に密閉する必要があることから、カバーの形状は、反りのない平坦な形であることが望ましい。カバーが反っている場合には、カバーをウェルに押し付けた際に、ウェルに充填した溶液と接触しない部分のカバー表面に生じ、カバーとウェルの間に空気が介在することになる。その結果溶接する際に、ウェル内に多量の空気が混入する可能性がある。従って、カバーの厚さには、平坦性を維持できるだけの最低限の厚みと、熱伝導性を確保できるだけの薄さが要求され、0.15 mm ~ 3.0 mm のものが適しており、より好ましくは0.25 mm ~ 1.5 mm のものが適している。

一方、容器の表面形状もカバー同様に平坦でなければ、カバーとの溶接が容易でなくなり、液体の密閉性が維持できないが、容器の裏面形状は必ずしも平坦である必要はない。しかしながら、容器の裏面、特に各ウェルの直下に対応する裏面部分を図2のように平坦にすることにより、平らなヒートブロックの上にマイクロウェルアレイを配置し、加熱することができる。現在一般に用いられているマイクロタイタープレートなどでは、各ウェルが円錐の外形を有しており、ヒートブロックもそれに合わせて円錐状の彫り込みが必要である。また、ヒートブロックの彫り込み部分とマイクロタイタープレートの円錐状になった側面が精度良く接触しない場合には、384穴のマイクロタイタープレートの各ウェルを均一に、かつ効率よく加熱することができない。このことから、マイクロウェルアレイの裏面を平坦にすることにより、形状が複雑かつ、高い加工精度の要求されるヒートブロックを使う必要がなくなり、ホットプレートなどの安価な機器を用いて加熱することが可能となる。さらに、マイクロタイタープレートの場合には、通常、粘着剤の付いたフィルムで、各ウェルをシールするが、粘着剤によるこのようなシール方法では、水槽中で各ウェルを液密に保つことはできない。

加えて、マイクロタイタープレートのウェル内部の水溶液が沸騰するレベルの温度にまで加熱する場合には、粘着剤の付いたシール用のフィルムでは密閉を維持することができず、機械的な力でウェルの上から抑えなければ、ウェル内部の溶液が蒸発してしまう。従って、現在市販されているサーマルサイ클ラー等の加熱器には、マイクロタイタープレートに貼り付けたフィルムを機械的に押し付ける蓋が備わっている。しかし、本発明のマイクロウェルアレイでは、ウェルごとに超音波溶着により液密に密閉されていることから、たとえウェル内部の溶液が沸騰する温度に加熱されようとも十分に密閉性を維持することができ、ウェル内の溶液が、ウェル外部に蒸発する危険性はない。すなわち、DNAを変性させるために90～100℃にマイクロウェルアレイを水槽中で加熱しても、ウェルの密閉性を維持することが可能である。このような完全な密閉が可能になるのは、マイクロウェルアレイを構成するカバーの一部と容器の一部を摩擦熱により溶かして接合するからである。そのため、溶着された各ウェルの密閉性、すなわち、各ウェルの機械的な密閉強さは、マイクロウェルアレイの材料であるプラスチックそのものの機械的な強さと同等となる。この結果、従来実施されてきた粘着剤による密閉の強さとは比較にならないほど強力な密閉が、超音波溶着により実現できる。以上のことから、マイクロウェルアレイを用いれば、ウェル内の溶液を、加熱器等を使わずに、水槽中でインキュベート（熱処理）することが可能である。また、何千枚ものマイクロウェルアレイを、たとえば、恒温水槽中に入れて、同時に

大量に熱処理することができ、加熱器を何千台も備える必要なく、安価にしかも高速に処理することが可能となる

加えて、容器の裏面が平坦であると、容器の裏側に沿って、光を反射する特性を持つ物体を置くことにより、図7のように、ウェル内の蛍光試薬等から発せられる検出用の光を、容器裏面の方向へ逃がすことなく、容器上方に配置された検出装置の方へ検出用の光を反射することが可能である。試薬から発せられる蛍光は、通常全方向に出射することから、反射する物体を裏面側に配置することにより、検出装置により測定できる蛍光を約2倍に高めること、すなわち、S/N比を2倍にすることができる。一方、容器裏面の方から励起光を入射し、裏面側に光検出器を配置している場合には、カバー上方に光を反射する物体を配置することにより同様な効果を実現することができる。一般にアルミニウムやステンレス等の金属の表面を研磨した反射材、アルミニウム・金などの高反射率を持つ金属を固体の表面にコーティングした部材等が光を反射する性質を持っている。さらに、容器の裏面、あるいは、ウェルの内壁に、蒸着やスパッタリング等によって金属をコーティングすることにより、光を反射する特性を持たせることも可能である。もちろん市販の鏡を利用しても同じような効果を得ることができる。

容器とカバーを溶接した後のマイクロウェルアレイについても平坦性と良好な熱伝導性が必要であることから、容器とカバーを合わせた厚さが、0.3～4.0 mm、好ましくは0.5～3.0 mm、であることが求められる。容器、カバーを合わせた厚さが0.3mmを下回ると、剛性が小さくなり、溶接時384穴のウェルに均一に圧力をかけて溶着することが難しくなる。

図8のように、マイクロウェルアレイの外周部に沿ってスカート部を形成すると、マイクロウェルアレイが反りにくくなると共に、汎用の分注装置のステージなどにマイクロウェルアレイを設置する際、特別なアダプターを使うことなく取り付けることができる。また、図8のようにスカート部の角に貫通穴を設けることにより、水槽中でインキュベートする際に、容器裏面に溜まった気泡がこの貫通穴を通して外へ逃げることができ、容器裏面全体を均一に加熱することが可能となる。

さらに射出成形により容器とカバーを形成する際には、一般的なピンゲートでも良いが、本発明の場合のように肉厚が薄い場合には、ピンゲートでは樹脂が流れにくく、反りが大きくなり、シリンジなどで微量の溶液を分注する際、各ウェルに確実に溶液をスポットすることが難しくなるため、図8のようにサイドゲートから樹脂を流し込むことが望ましい。

ウェルを高密度に配置すると、隣接するウェルからの光の漏れ、すなわち、光クロストークの

影響が無視できなくなる場合があるが、その場合には、例えば、容器の原材料に顔料や微細金属粉末を混ぜ、容器を不透明にすることによって防止することが可能である。

図9は、図1に示されるマイクロウェルアレイにゲノムDNA（検体）をスポッティングし、乾燥後反応試薬（液体）を分注・密閉する工程を示している。ここでいうDNAとは、動植物の細胞に含まれている状態のままのDNA、すなわち細胞に含有された状態のDNAを指しているのではなく、酵素と反応させるためにDNAとして細胞から取り出されたものや、溶液の中に剥き出しに溶け込んでいるDNA、あるいは、増幅や化学合成されたDNA等を指している。図9Aでは、微量のDNAをスポッティングし、水溶液を乾燥させた状態にあり、図9Bでは、DNAと反応させる試薬をウェルの容積より3～9割程度多めに非接触式の分注機によりスポッティングする。液体には表面張力の作用があり、ウェルに納まらない部分の液体は盛り上がるようにしてウェルからこぼれずに保持されている。次に、図9C、9Dに示されるようにウェルに充填された液体をカバーの押し出し部によりウェルの外側へ押し出すことにより、ウェルに空気がほとんど残らないように密閉することができる。さらに図9Eのように超音波によりウェルの隆起部をカバーに押し当て、隆起部を溶融させることにより、隆起部とカバーの接触部が接合し、ウェルを液密にシールすることができる。

図9のように、ウェルに液体をスポッティングする際、ウェルの容積より3～9割程度多めにスポッティングすることが望ましいが、液体の濃度が非常に高い場合には、気泡が多少混入しても反応が進行し、かつ検出用の蛍光が多量出射されることから、図10のように溶着後のウェルの容積程度の液をスポッティングしておくことで、反応・検出が確保できる場合もある。従って、反応・検出の感度と、ウェルに充填する試薬の濃度を勘案し、最適量をスポッティングすることが必要である。

ところで、各ウェルに溶液を分注する際、最初は容器が洗浄されているため、接触式の分注機により溶液を分注することができるが、続いて別の溶液を分注する際には、接触式の分注機を用いると、最初の溶液と2回目の溶液が混ざってしまいコンタミネーションの原因となることから、2回目の分注では、図11のように非接触式の分注機により溶液を分注することが望ましい。ここで、接触式の分注機とは、マイクロウェルアレイに分注する際、シリンジやチップ、あるいは、液滴の付着した状態のシリンジやチップなどの先をウェルに接触させることにより、スポットする液体をウェルに分注する装置を指す。一方非接触式の分注機とは、シリンジやチップなどの先をウェルに接触させずに、空気圧、バルブ、圧電素子、熱膨張などによって押し出すことにより

分注できる装置を指している。本発明のマイクロウェルアレイでは、ウェルの容積が小さく、開口部も狭いケースがあることから、2回目以降の分注では、非接触式の分注機により分注することが望ましい。

また溶液をウェルに分注した後に溶液を乾燥させることにより、異なる溶液を各ウェルに繰り返し分注することが可能である。DNAや蛍光試薬は、乾燥してもその性質が劣化することがほとんどなく、また、酵素についても、乾燥させることができる場合が多い。そのため、アッセイの際に共通する成分となる試薬は、ウェルあるいはカバー表面にあらかじめ一緒に分注し、乾燥させた後に、ウェルごとに異なる試薬を分注機でウェルに添加するという方法をとることもできる。さらに、試薬または検体の少なくとも一方を容器のウェルに分注して担持し、他の一方をカバー表面に担持し、ウェルとカバーを超音波溶着して接合し、ウェルごとに試薬と検体を反応させるようにすることも可能である。

カバーと液体の入った容器とを超音波により溶接する際には、超音波を溶接部に照射する必要がある。超音波溶着は、超音波電気エネルギーを機械的振動エネルギーに変換し、圧力を印加することによって溶着される2つの部品の接合面に、強力な摩擦熱を発生させ、プラスチックを溶融し溶着を行う。ここで、溶着部分に伝達されるエネルギーは、一般に

$$\begin{aligned} \text{超音波のエネルギー} &\propto (\text{力}) \times (\text{超音波の周波数}) \\ &\quad \times (\text{ホーンの振幅}) \times (\text{溶着に要する時間}) \\ &\propto (\text{出力}) \times (\text{溶着に要する時間}) \end{aligned}$$

と表現できるため、上記式の右辺の積算量が一定である限りは、溶着部分に一定のエネルギーを供給することができる。従って、力を低く設定する必要がある条件下でも溶着時間を長くしたり、ホーンの振幅を上げることによって、溶着部分に伝達されるエネルギーを一定に保つことができる。本発明のように溶着する部品のサイズが比較的大きく、かつ、溶着する隆起部の全体の長さが大きい場合には、超音波装置の出力に上限があるため、通常溶着時間を長くすることによってエネルギーを大きくしている。

しかしながら本発明のように、溶着により接合しようとする容器に液体、たんぱく質(酵素)、DNA等が入っている場合には、超音波振動を長い時間印加すると、DNA、あるいは、たんぱ

く質が切断されたり、高温のため活性を失ったりするため、ウェル内での化学反応が進行しなくなる。また、液体も振動の時間が長く続くことにより、ウェルから弾き飛ばされることになる。図12は、TPX（メチルペンテンコポリマー）により成形したマイクロウェルアレイのウェルに、インベーター試薬（酵素・蛍光など）とDNAを入れて、超音波により各ウェルを液密に密閉した際、反応後に検出される蛍光の量を溶着時間に対してプロットした実験結果である。この時、力は、溶着部分の長さ1cmあたり約40N、超音波の周波数は20kHz、ホーンの振幅は36ミクロンであった。溶着時間が0.05~0.8秒の範囲内では、酵素が働き、酵素反応の結果切り離される蛍光分子が、図12のように検出される。しかし溶着時間が0.8秒を超えると、検出される蛍光の量が低下していき、1秒間溶着すると蛍光は全く検出されなかった。このことから、DNA やたんぱく質の超音波による密閉は、0.8秒以内で実施しなければならないことが本発明の実験により確認された。

図13は、TPX（メチルペンテンコポリマー）により成形したマイクロウェルアレイのウェルに、インベーター試薬（酵素など）とDNAを入れて、超音波により各ウェルを液密に密閉した際の、ウェルに残った液量とホーンの振動を開始する時点でカバーに加えられている力（発振加圧）の関係を示している。この時、超音波の周波数は20kHz、ホーンの振幅は36ミクロン、溶着時間は0.25秒であった。図13のように、溶融する隆起部の長さ1cmあたり、0.3~100Nの力が加わった時点、より好ましくは、30~100Nの時点で、ホーンの振動を開始するとウェルに気泡がほとんど混入することなく、密閉することができる。ここで、「隆起部の長さ」とは、この場合、ウェルの周りに形成された溶融する部分の長さを指している。例えば、直径0.19cmの隆起部の長さの合計は、384穴のマイクロウェルアレイ全体で、

$$0.19 \times \pi \times 384 = 229 \text{ cm}$$

となる。従って、超音波振動を開始する際、マイクロウェルアレイ全体に仮に5000Nの力が加わっていたとしたら、

$$5000 / 229 = 22 \text{ N/cm}$$

となり、溶融する隆起部の長さ1cmあたり、22Nの力が加わったと解釈できる。0.3N未満の圧力で振動を開始すると、ウェル内の液体が振動でウェルから弾き出されるため、溶着時間を短くしたり、ホーンの振幅を小さくしても、液体を気泡が混入することなく密閉することは困難である。このようにホーンの発振前にカバー全体に力を加えておくことで、すなわち、加圧発振させることで、カバーとウェル周囲の隆起部を十分に密着させ、ウェル内の液体を外部に流出さ

せることなく、密閉することが可能である。

通常、TPXやPCからなるプラスチック部品の超音波溶着では、ホーンの振幅としてそれぞれ45ミクロン、60ミクロン程度の振幅が必要とされるが、本発明のようにウェル内に液体が入っている場合には、溶着時に液体がウェルから弾き出されることを抑制するため、ホーンの振幅を40ミクロン以下に設定することが好ましい。一方、振幅の下限として30ミクロンを下回る振幅では、超音波振動のエネルギーが溶着部分に効率よく伝達されないため、溶着に必要な摩擦熱が十分に供給されず、溶着不良になる。さらに発振時の加圧力として、溶着部の単位長さあたり30～100 N/cmの力を加えることが望ましいため、本発明の例では、

$$229 \text{ cm} \times 30 \sim 100 \text{ N/cm} = 6870 \sim 22900 \text{ N}$$

すなわち、最大加圧力として7000～23000 Nの力を加えることができる加圧機構を備えていることが望ましい。

実際に、上記384個のウェルが形成されたマイクロウェルアレイにDNAを分注して乾燥させ、その後0.4  $\mu$ l（ウェル容積は0.6  $\mu$ l）の試薬を入れ、カバーをして、各ウェルごとに超音波により溶着した。その際、ホーンの振幅を36ミクロン、溶着時間を0.25秒、発振時の加圧力を10000 Nに設定したところ、溶着時の最大発振出力は4.1～5.0 kWであった。溶着時、ウェル内の試薬はウェルから弾き出されることなく、超音波溶着後のウェル周縁部の溶着性、密閉性は、共に良好であった。

さて、上記のマイクロウェルアレイ、分注機、超音波溶着装置を用い、Invader法、TaqMan PCR法などでSNP（一塩基多型）のタイピングを行う場合には、作業の流れ（システム）として図14(a)に示すように次の番号順に実施する必要がある。ここでは384穴のマイクロウェルアレイを用いた場合のSNP頻度解析の方法を説明する。

(1) それぞれのマイクロウェルアレイに、分注する検体と試薬の情報に対応したバーコードを貼り付ける。また384種類のDNA（検体、すなわち384人のDNA）が入ったマザープレートにもバーコードを添付する。

(2) マイクロウェルアレイの容器表面のウェルに分析の対象となる384種類のDNAを、別々のウェルに接触式の分注機により適量分注し、水分を蒸発させて乾燥させる。この時、マイクロウェルアレイに貼られたバーコードの検体に対応する番号と、マザープレートの検体番号が



一致するような組み合わせを選択する。また、分注が終了すると、工程を管理しているサーバーには、バーコードが貼られたマイクロウェルアレイの最初の分注作業が終了したという情報が伝えられる。

(3) 容器表面のウェルに全ウェル共通の試薬（マイクロウェルアレイごとに異なる）を非接触式の分注機により分注する。この時に用いる試薬の種類と、マイクロウェルアレイに貼られた試薬に対応するバーコード番号が一致するような組み合わせを選ぶ。分注後、分注し終わったマイクロウェルアレイのバーコードをバーコードリーダーで読み取ると、工程を管理しているサーバーに、バーコードが貼られたマイクロウェルアレイの2回目の分注作業が終了したという情報が伝えられる。

(4) 分注直後、ウェル内の試薬が乾燥する前に、カバーを容器に押し付けて、各ウェルとカバーを超音波により溶着する。

(5) 恒温水槽、あるいは、サーマルサイクラー等の加熱装置にマイクロウェルアレイをセットし、試薬と検体（DNA）を一定時間反応（インキュベーション）させる。

(6) 反応後、マイクロウェルアレイを蛍光評価装置（プレートリーダー）にセットし、マイクロウェルアレイのバーコードをバーコードリーダーによって読み取らせた後、蛍光の強度をウェルごとに読み取らせる。測定後、工程を管理しているサーバーに、バーコードが貼られたマイクロウェルアレイの蛍光分析作業が終了したという情報が伝えられる。

(7) 特定の塩基配列と蛍光の色が対応していることを利用し、検出した蛍光の色と強度に応じて、384種類のDNAのSNP配列情報を分析し、SNPの頻度を解析（タイピング）する。

上記バーコードの番号は、例えば下記のように記載されている。

△△△—○○○

ここで、△△△はマイクロウェルアレイに分注する試薬の種類を示す番号、○○○はマイクロウェルアレイに分注するDNAの種類を示す番号である。

以上に説明したSNPの頻度解析方法は、ウェルにDNAと試薬を順に分注し、混合させた後に反応させる場合である。しかしながら、別の方法として、カバー表面に接触式の分注機で試薬（あるいはDNA）を分注・乾燥し、ウェルにDNAが入った水溶液（あるいは試薬）を接触式の分注機で分注し、ウェルの水分が蒸発して乾燥する前に、カバーを容器に押し付けて、カバー

表面の試薬とウェル内のDNAを混合・反応させることも可能である(図14(c))。この他にも図14(b)に示す方法もある。

上記SNPの頻度解析(タイピング)方法では、384種類のDNAを個々のウェルに分注し、共通の試薬を384個のウェルに分注するが、遺伝子の診断にマイクロウェルアレイを用いる場合には、384種類の試薬をあらかじめ384個のウェルに分注し、乾燥させた後に、一個人のDNAを384個のウェル全体に分注することにより、一個人の384種類のSNP情報、すなわち384種類の遺伝情報を得ることができる(図14(e))。

このような遺伝子診断を行う際の作業の流れは具体的には、下記ようになる。

(1) それぞれのマイクロウェルアレイに分注する検体と試薬の情報に対応したバーコードを貼り付ける。また384種類の試薬(384種類の遺伝子に対応する試薬)の入ったマザープレートにもバーコードを添付する。

(2) マイクロウェルアレイの容器表面のウェルに分析の対象となる384種類の試薬をそれぞれ別々のウェルに接触式の分注機により適量分注し、水分を蒸発させて乾燥させる。この時、マイクロウェルアレイに貼られたバーコードの試薬に対応する番号と、マザープレートの試薬番号が一致するような組み合わせを選択する。また、分注が終了すると、工程を管理しているサーバーには、バーコードが貼られたマイクロウェルアレイの最初の分注作業が終了したという情報が伝えられる。

(3) 容器表面の全ウェルに一個人のDNAを非接触式の分注機により分注する。この時に用いるDNA(一個人)と、マイクロウェルアレイに貼られたDNA(一個人)に対応するバーコード番号が一致するような組み合わせを選ぶ。分注後、分注し終わったマイクロウェルアレイのバーコードをバーコードリーダーで読み取ると、工程を管理しているサーバーに、バーコードが貼られたマイクロウェルアレイの2回目の分注作業が終了したという情報が伝えられる。

(4) 分注直後、ウェル内の混合溶液が乾燥する前に、カバーを容器に押し付けて、各ウェルとカバーを超音波により溶着する。

(5) 恒温水槽、あるいは、サーマルサイクラー等の加熱装置にマイクロウェルアレイをセットし、試薬と検体(DNA)を一定時間反応(インキュベーション)させる。

(6) 反応後、マイクロウェルアレイを蛍光評価装置(プレートリーダー)にセットし、マイクロウェルアレイのバーコードをバーコードリーダーによって読み取らせた後、蛍光の強度をウェルごとに読み取らせる。測定後、工程を管理しているサーバーに、バーコードが貼られたマイ

クローエルアレイの蛍光分析作業が終了したという情報が伝えられる。

(7) 特定の塩基配列と蛍光の色が対応していることを利用し、検出した蛍光の色と強度に応じて、一個人に対する384種類のSNP（遺伝子）のタイプを分析し、診断を行う。

上記方法の他にも図14(d)に示す方法によって遺伝子の診断を実施することが可能である。

図15は本発明の別のマイクロウェルアレイの斜視図である。ここでも384個のウェルがプラスチック容器の表面に、縦横の間隔が4.5mmになるように形成されており、中間体を上方から容器に押し当てることによりウェルに充填された液体を密閉することができる。カバーと容器の位置を確実に一致させ、簡便に接合させるため、図1と同様に四隅にスルーホールとガイドピン、はめ込み部を設けている。中間体とは、フィルム、シート、粘着剤、接着剤などから構成される密閉用の材料を指し、具体的には、「粘着剤+シート+粘着剤」、「粘着剤+フィルム+粘着剤」、「接着剤+シート+粘着剤」、「接着剤+フィルム+粘着剤」、「接着剤+シート+接着剤」、「接着剤+フィルム+接着剤」、「粘着剤+シート」、「接着剤+フィルム」、「シートのみ」、「粘着剤のみ」、「接着剤のみ」などの組み合わせが挙げられる。平坦で、かつ、固い材質からなるカバーだけではシールすることができない場合に、合成樹脂などの可撓性を有する物質から構成される中間体を使用することにより、密閉することができる。そして、粘着剤や接着剤を使用することにより、密閉性を高めることができる。ここで、シートとは厚さ0.10mm以上に延ばされたプラスチックのことであり、フィルムとは厚さ0.10mm未満に薄く延ばされたプラスチックのことである。

以上のような中間体の組み合わせにより、作業性を高めることが可能である。例えば、密閉作業を行う際、粘着剤を予めシートの両面に塗布し、シート片面の離型紙を剥がしてカバーにシートを貼り付け、カバーとシートを一体型にする。そして、シートの他方の面についている離型紙を剥がして、この一体となったカバーとシートを容器表面に形成されたウェルに押し付ける。このようにして、ウェルを液密にシールすることが可能である。

また別の方法として、カバーの表面に予め粘着剤を塗布した後、この粘着剤と一体となったカバーを容器表面のウェルに押し付けることができる。また、中間体として、例えば弾力性を有するシート単体を利用することももちろん可能である。

シートの材質としては、ウェル内の液体を密閉することができる弾力性を有するポリオレフィン、ポリエチレン、シリコーンゴム、ポリウレタンゴム、エラストマー等が望ましい。またその形態として、ウェルの隆起部に接触している部分が局部的に圧縮され、高い密閉性を維持するこ

とができる発泡シートが特に望ましい。

中間体の厚さは、薄すぎると液体を密閉することができないこと、また、厚すぎると熱伝導性が低下することから、0.1 mm～1.5 mmのものが適しており、より好ましくは0.3 mm～1.0 mmのものが適している。

ここでもカバーの形状は、反りのない平坦な形であることが望ましい。カバーが反っている場合には、カバーによって中間体をウェルに押し付けた際に、ウェルと接触しない部分が中間体表面に生じ、その結果中間体とウェルの間に空気が介在する。そのため接合した際に、ウェル内に空気が混入する可能性がある。従って、カバーの厚さとしては、平坦性を維持できるだけの最低限の厚みと、熱伝導性のある程度確保できる0.15 mm～3.0 mmのものが適しており、より好ましくは0.25 mm～1.5 mmのものが適している。

検出する蛍光の量が少ない場合には、中間体を構成する材料として、光を反射するフィルムあるいはシートを使用することにより、検出する蛍光量を増やすことが可能である。またフィルム、シート、あるいはカバーの表面に真空蒸着やスパッタリング法により、金やアルミニウム等の反射用の金属膜をコーティングして、反射量を高めることもできる。この場合、励起光・蛍光ともに、容器の裏面側から照射・検出することになる。

別の方法として、ウェルの内壁に光反射用の金属膜をコーティングし、透明な中間体を使うことによって、励起光をカバー側から照射することも可能である。このように熱伝導性、光学特性など、中間体の特性を制御することにより目的とするアッセイに最適な条件を提供することができる。

図16は図15のB-B'に沿った断面図であり、図のようにウェルは、ウェルの開口部、隆起部、液体逃げ溝から構成されている。中間体は、この例では、弾力性を有するシートであり、カバーに下向きの圧力を加えることによってシートを隆起部に押し付け、シートによりウェルに入っている液体を密閉することができる。シートを挟んでカバーを容器に固定するには、図15のようにはめ込み部を形成し、カバーに形成した挿入部を、容器に形成した受け部にはめ込むことにより、作業性よく簡便に固定することができる。

図17は、図15に示されるマイクロウェルアレイにゲノムDNAをスポッティングし、乾燥後反応試薬（液体）を分注・密閉する工程を示している。図17Aでは、微量のDNAをスポッティングし、図17Bでは、DNAと反応させる試薬をウェルの容積より3～9割程度多めにスポッティングする。液体には表面張力の作用があり、ウェルに納まらない部分の液体も盛り上が

るようにしてウェルからこぼれずに保持されている。次に、図 17 C、17 D に示されるようにウェルに充填された液体を中間体によりウェルの外側へ押し出すことにより、ウェルに空気が残らないように密閉することができる。

図 15 に示される本発明では、中間体が不透明な場合、ウェルの上方からウェル内の溶液に光をあてることはできないが、容器を上下逆さまにすることにより、中間体に遮られることなく光（励起光など）をウェルに照射することができる。そして、光を照射したのと同じ方向から蛍光を検出することが可能である。

図 15 に示される本発明では、ウェル内に液体を密閉する際、ウェル内部の液体に超音波のエネルギーが直接伝わらないため、ウェル内部の液体を一時的にでもプラスチックの溶着温度（200～250℃）にさらしたくない場合に特に有効である。

またカバーと容器を強固に接合し、かつ、ウェルと中間体全体を液密にする場合には、図 18 のように、容器の外周部に接着剤を流し込む細長い溝（凹部）を形成し、そこに接着剤を流し込んで、カバーに形成した凸部を凹部にはめ込むようにして接着することが可能である。あるいは外周を隆起部で囲み、超音波溶着することにより、シールすることもできる。

マイクロウェルアレイは、標準的なサイズの場合、縦が約 8 cm、横が約 12 cm と比較的面積が広いことから、ウェルを覆っている中間体全体に均一な圧力がかかりにくく、その結果、ウェルの密閉性にバラツキが生じる場合がある。この場合、図 19 のように、例えば 4 個のウェルに囲まれた位置に接着剤を流し込む溝（凹部）を設け、そこに接着剤を流し込んで、カバーに形成した凸部をその容器の溝にはめ込むことにより、均一な密閉性を保持することが可能である。

また別のケースとして、マイクロウェルアレイの中央部に位置するウェルを覆っている中間体にカバーの圧力がかかりにくく密閉性が悪くなることもある。この場合には、図 20 のように、マイクロウェルアレイの中央部に、はめ込み部と周囲の隆起部を設け、中間体がウェルから離れるのを防ぐことが可能である。

さらに別のケースとして、シートやフィルムの表面に予め粘着剤や接着剤を塗布して中間体を構成し、中間体をウェルに被せた際に、中間体と容器とを接着させ、ウェルを液密にシールすることもできる。この場合、塗布材料の厚さも中間体の厚さに含めて考える。従って、上記と同様に、密閉性及び熱伝導性を考慮すると、シートあるいはフィルムと、塗布した材料をあわせた厚さが、0.15 mm～3.0 mm のものが適しており、より好ましくは 0.25 mm～1.5 mm のものが適している。

このように、「中間体」という表現には、カバーと容器の間に挟まれるシート、フィルム、接着剤、粘着剤がすべて含まれ、「中間体の厚さ」は、密閉性及び熱伝導性の観点から、そうした材料の厚さを合計した厚さが相当する。

ウェル内の液体を密閉するには、上記図 1 及び図 15 以外にも、例えば、図 21～図 24 に示される方法で行うことができる。図 21 では容器に隆起部を設ける代わりに、カバーに液体押し出し部を形成し、ウェルに充填した溶液を液体逃げ溝に押し出すことで、気泡がウェル内に混入しないように密閉している。図 22 では液体押し出し部が中間体に形成してあり、この中間体をウェルに押しつけることで、ウェルからはみ出ている余分の溶液を、ウェル内に気泡が残存しないように逃げ溝に押し出すことができる。図 23 では、液体の逃げ溝を設けていないが、カバーに形成された押し出し部により、余分の液体をウェルの外側に押し出し、ウェル内への気泡の混入を防ぐことができる。また図 24 では、カバー側に液体押し出し部と超音波溶着のための隆起部を設けることにより、ウェルに気泡が残存しないように密閉することができる。

#### (実施例および比較例)

以下に本発明の実施例および比較例を示し、さらに詳細に説明を行う。

#### (実施例 1～9)

##### 実験

カバー及び容器は、金型を加工し、メチルペンテンコポリマー及びポリカーボネートをその金型で射出成形することにより作製した。カバーのサイズは、81 mm×123 mm×0.4 mm、容器のサイズは 81 mm×123 mm×1.6 mm である。容器の表面に 384 個の断面が台形状のウェルを形成し、その大きさは、開口部の直径 1.3 mm、底面部の直径 1.1 mm、深さ 0.8 mm (容積 0.9  $\mu$ L/well)、あるいは、開口部の直径 1.1 mm、底面部の直径 0.9 mm、深さ 0.13 mm (容積 0.1  $\mu$ L/well) とした。また隆起部の高さは 0.4 mm、内径を 1.4 mm、外径を 2.4 mm、逃げ溝の内径を 3.0 mm、外径を 4.0 mm、深さを 0.6 mm とした。カバーに形成した液体押し出し部の高さは 0.2 mm、外径は 0.9 mm である。

初めに、マイクロウェルアレイに検体と試薬に対応するバーコードを添付し、また 384 種類の DNA (検体、すなわち 384 人の DNA) が入ったマザープレートにもバーコードを添付した。その後実験台の上に置いた容器の各ウェルに、接触式のスポッティング装置により 384 種類のゲノム DNA (10 ng/ $\mu$ L、20 ng/ $\mu$ L、40 ng/ $\mu$ L) を 1  $\mu$ L ずつ、または 0.2  $\mu$ L 分注した。容器を大気中に放置して溶媒を蒸発させた後、波長 570 nm に蛍光強度のピーク

を持つ Invader 法の試薬約  $1.6 \mu\text{L}$ 、または  $0.2 \mu\text{L}$  を非接触式のスポッティング装置にて各ウェルに分注した。試薬を分注した後、ウェルから余分にはみ出ている試薬をウェルから押し出すようにカバーをウェルに押し当て、ウェル内の液体を密閉した。そして各ウェルの開口部の隆起部とカバーを超音波装置により溶着接合した。超音波の周波数が  $20 \text{ kHz}$ 、ホーンの振幅が  $36 \text{ ミクロン}$ 、最大発振出力が  $5.0 \text{ kW}$  の超音波溶着装置を使用した。 $95^\circ\text{C}$  で  $5 \text{ 分間}$  DNA を変性した後、 $63^\circ\text{C}$  の恒温槽中で  $4 \text{ 時間}$  反応させ、反応終了後プレートリーダーで蛍光強度を測定し、SNP の頻度を解析 (タイピング) した。各工程が終了するごとにバーコードをバーコードリーダーで読み取り、サーバーとなるコンピューターで各マイクロウェルアレイの工程ごとの進捗度を管理した。ウェルの密閉状態は、溶着直後においても、また  $4 \text{ 時間}$  の反応終了後ともに気泡の混入が認められず良好であった。ゲノム DNA の量、ウェル容積、溶着時間、発振加圧を表 1 のように変えた。また実施例 8 では、光を反射する鏡を容器裏面に配置した。結果を表 1 に示す。

(実施例 10 ~ 18)

#### 実験

カバー及び容器は、金型を加工し、メチルペンテンコポリマー及びポリカーボネートをその金型で射出成形することにより作製した。カバーのサイズは、 $81 \text{ mm} \times 123 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$ 、容器のサイズは  $81 \text{ mm} \times 123 \text{ mm} \times 1.6 \text{ mm}$  である。容器の表面に  $384$  個の断面が台形状のウェルを形成し、その大きさは、開口部の直径  $1.6 \text{ mm}$ 、底面部の直径  $1.4 \text{ mm}$ 、深さ  $0.6 \text{ mm}$  (容積  $1.1 \mu\text{L/well}$ ) のものと、開口部の直径  $1.6 \text{ mm}$ 、底面部の直径  $1.4 \text{ mm}$ 、深さ  $0.8 \text{ mm}$  (容積  $1.4 \mu\text{L/well}$ ) のものの 2 種類とした。隆起部の高さは  $0.5 \text{ mm}$ 、内径を  $1.6 \text{ mm}$ 、外径を  $2.0 \text{ mm}$ 、逃げ溝の内径を  $2.5 \text{ mm}$ 、外径を  $3.1 \text{ mm}$ 、深さを  $0.6 \text{ mm}$  とした。また、カバーと容器の間に挟む中間体として、ポリオレフィンの発泡シート ( $0.5 \text{ mm}$  厚) を使用した。

初めに、マイクロウェルアレイに検体と試薬に対応するバーコードを添付し、また  $384$  種類の DNA (検体、すなわち  $384$  人の DNA) が入ったマザープレートにもバーコードを添付した。その後、実験台の上に置いた容器の各ウェルに、接触式のスポッティング装置により  $384$  種類のゲノム DNA ( $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) を  $1 \mu\text{L}$  ずつ分注した。容器を大気中に放置して溶媒を蒸発させた後、波長  $570 \text{ nm}$  に蛍光強度のピークを持つ Invader 法の試薬約  $1.6 \mu\text{L}$  及び  $2.0 \mu\text{L}$  を非接触式のスポッティング装置にて各ウェルに分注した。

試薬を分注した後、ウェルから余分にはみ出ている試薬をウェルから押し出すようにシート、カバーの順にウェルに押し当て、ウェル内の液体を密閉した。そしてマイクロウェルアレイの外周部の隆起部を超音波装置により溶着し、液密な状態にして、95℃で5分間DNAを変性した後、63℃の恒温水槽中で4時間反応させ、反応終了後プレートリーダーで蛍光強度を測定し、SNPの頻度を解析（タイピング）した。各工程が終了することにバーコードをバーコードリーダーで読み取り、サーバーとなるコンピュータで各マイクロウェルアレイの工程ごとの進捗度を管理した。その際、容器を上下逆さまにして、シートに遮られていないウェルの側から光を照射し、蛍光も同じ側から検出した。ウェルの密閉状態は、溶着直後においても、また4時間の反応終了後もともに気泡の混入が認められず良好であった。超音波の周波数が20kHz、ホーンの振幅が36ミクロン、最大発振出力が5.0kWの超音波溶着装置を使用した。ゲノムDNAの量、溶着時間、発振加圧は表1に示した。

#### 【実施例19】

##### 実験

カバー及び容器は、金型を加工し、メチルペンテンコポリマー及びポリカーボネートをその金型で射出成形することにより作製した。カバーのサイズは、81mm×123mm×0.4mm、容器のサイズは81mm×123mm×1.6mmである。容器の表面に384個の断面が台形状のウェルを形成し、その大きさは、開口部の直径1.3mm、底面部の直径1.1mm、深さ0.8mm（容積0.9μL/well）とした。また隆起部の高さは0.4mm、内径を1.4mm、外径を2.4mm、逃げ溝の内径を3.0mm、外径を4.0mm、深さを0.6mmとした。カバーに形成した液体押し出し部の高さは0.2mm、外径は0.9mmである。

初めに、マイクロウェルアレイに検体と試薬に対応するバーコードを添付し、また384種類のDNA（検体、すなわち384人のDNA）が入ったマザープレートにもバーコードを添付した。その後実験台の上に置いた容器の各ウェルに、接触式のスポッティング装置により384種類のゲノムDNA（10ng/μL）を1μLずつ分注した。容器を大気中に放置して溶媒を蒸発させた後、波長570nmに蛍光強度のピークを持つTaqMan法の試薬約1.6μLを非接触式のスポッティング装置にて各ウェルに分注した。試薬を分注した後、ウェルから余分にはみ出ている試薬をウェルから押し出すようにカバーをウェルに押し当て、ウェル内の液体を密閉した。そして各ウェルの開口部の隆起部とカバーを超音波装置により溶着接合し、液密な状態にした。超音波の周波数は20kHz、ホーンの振幅は36ミクロンであった。サーマルサイクラーにて、



95℃で10分間 DNA を変性した後、(95℃で1分、60℃で3分)というインキュベーションのサイクルを40回行った。反応終了後プレートリーダーで蛍光強度を測定し、SNPの頻度を解析(タイピング)した。各工程が終了するごとにバーコードをバーコードリーダーで読み取り、サーバーとなるコンピュータで各マイクロウェルアレイの工程ごとの進捗度を管理した。ウェルの密閉状態は、溶着直後においても、また反応終了後もともに気泡の混入が認められず良好であった。超音波の周波数が20kHz、ホーンの振幅が36ミクロン、最大発振出力が5.0kWの超音波溶着装置を使用した。ゲノムDNAの量、溶着時間、発振加圧を表1のように変えた。結果を表1に示す。

(比較例1~3)

#### 実験

カバー及び容器は、金型を加工し、メチルペンテンコポリマー及びポリカーボネートをその金型で射出成形することにより作製した。カバーのサイズは、81mm×123mm×0.4mm、容器のサイズは81mm×123mm×1.6mmである。容器の表面に384個の断面が台形状のウェルを形成し、その大きさは、開口部の直径1.3mm、底面部の直径1.1mm、深さ0.8mm(容積0.9μL/well)、あるいは、開口部の直径1.1mm、底面部の直径0.9mm、深さ0.03mm(容積0.02μL/well)とした。また隆起部の高さは0.4mm、内径を1.4mm、外径を2.4mm、逃げ溝の内径を3.0mm、外径を4.0mm、深さを0.6mmとした。カバーに形成した液体押し出し部の高さは0.2mm、外径は0.9mmである。

初めに、実験台の上に置いた容器の各ウェルに、スポッティング装置により384種類のゲノムDNA(40ng/μL)を1μLずつ、または0.2μL分注した。容器を大気中に放置して溶媒を蒸発させた後、波長570nmに蛍光強度のピークを持つInvader法の試薬約1.6μL、または0.2μLをスポッティング装置にて各ウェルに分注した。試薬を分注した後、ウェルから余分にはみ出ている試薬をウェルから押し出すようにカバーをウェルに押し当て、ウェル内の液体を密閉した。そして各ウェルの開口部の隆起部とカバーを超音波装置により溶着接合した。95℃で5分間DNAを変性した後、63℃の恒温槽中で4時間反応させ、反応終了後プレートリーダーで蛍光強度を測定した。ウェルの密閉状態は、溶着直後においても、また4時間の反応終了後もともに気泡の混入が認められず良好であった。超音波の周波数が20kHz、ホーンの振幅が36ミクロン、最大発振出力が5.0kWの超音波溶着装置を使用した。溶着時間、発振

加圧、ウェル容積を表1のように変えた。測定結果を表1に示す。表1から明らかなように、ウェル容積が  $0.02\mu\text{L}$  の際には、液量が少なすぎるために反応性が悪く、蛍光も検出できなかった。

(比較例4～10)

#### 実験

384ウェルマイクロタイタープレートに、10 ng、20 ng、40 ng、100 ngのゲノムDNAを分注し、それぞれのウェルに  $20\mu\text{L}$  あるいは  $40\mu\text{L}$  の Invader 法の試薬（波長570 nmに蛍光強度のピークを持つ）を分注した。各ウェルを液密な状態にするため、キャップを被せ、 $95^{\circ}\text{C}$  で5分間DNAを変性した後、 $63^{\circ}\text{C}$  に設定したサーマルサイクラーで4時間反応させ、反応終了後プレートリーダーで蛍光強度を測定した。結果を表1に示した。

(比較例11)

#### 実験

384ウェルマイクロタイタープレートに、10 ngのゲノムDNAを分注し、それぞれのウェルに  $20\mu\text{L}$  の TaqMan 法の試薬（波長570 nmに蛍光強度のピークを持つ）を分注した。各ウェルを液密な状態にするため、キャップを被せ、 $95^{\circ}\text{C}$  で10分間DNAを変性した後、（ $95^{\circ}\text{C}$  で1分、 $60^{\circ}\text{C}$  で3分）というインキュベーションのサイクルを40回行った。反応終了後プレートリーダーで蛍光強度を測定した。結果を表1に示す。

(超音波溶着実験に関する実施例20～21と比較例12～13)

#### 実験

カバー及び容器は、金型を製作し、メチルペンテンコポリマー及びポリカーボネートをその金型で射出成形することにより作製した。カバーのサイズは、 $81\text{mm} \times 123\text{mm} \times 0.4\text{mm}$ 、容器のサイズは  $81\text{mm} \times 123\text{mm} \times 1.6\text{mm}$  である。容器の表面に384個の断面が台形状のウェルを形成し、その大きさは、開口部の直径1.3 mm、底面部の直径1.1 mm、深さ0.8 mm（容積  $0.9\mu\text{L/well}$ ）とした。また隆起部の高さは0.4 mm、内径を1.4 mm、外径を2.4 mm、逃げ溝の内径を3.0 mm、外径を4.0 mm、深さを0.6 mmとした。カバーに形成した液体押し出し部の高さは0.2 mm、外径は0.9 mmである。

初めに、実験台の上に置いた容器の各ウェルに、スポッティング装置により水を  $1\mu\text{L}$  ずつ分注した。水を分注した後、ウェルから余分にはみ出ている水をウェルから押し出すようにカバーをウェルに押し当て、ウェル内の水を密閉した。そして各ウェルの開口部の隆起部とカバーを超

音波装置により溶着接合した。超音波の周波数が20kHz、最大発振出力が5.0kWの超音波溶着装置を使用した。溶着時の最大発振出力は4.1～5.0kWであった。その後、95℃で5分間加熱した後、63℃の恒温槽中に4時間置いた。ウェルの密閉状態は、溶着直後においても、また4時間後も、ともに気泡の混入が認められず良好であった。溶着時間、発振加圧、ホーンの振幅を表2のように変えた。表2から明らかなように、ホーンの振幅は、30μm～40μmに設定することが、ウェルを液密にする上で極めて好ましいものであった。

表1及び表2から明らかなように、メチルペンテンコポリマーまたはポリカーボネートからなるマイクロウェルアレイを使用することによって、従来のマイクロタイタープレートと比較し、約10分の1のDNA及び試薬量で、同等の蛍光強度を得ることができた。また、ホーンの振幅、溶着時間と発振加圧を最適化することにより、安定した測定が実現できるようになった。加えて、反射体をマイクロウェルアレイ裏面に配置することにより、検出できる蛍光の強度を約2倍に高めることができた。

上記のように、本発明によれば、溶着後のウェルの容積にほぼ等しい量、あるいは、それを超える量の液体をウェルにスポットし、その液体をカバー、中間体によって、ウェルから押し出すことにより、空気がウェル内にほとんど残存しないように液体を密閉すること可能である。そして蛍光試薬を微少な空間に閉じこめることによって、蛍光試薬全体を効果的に励起し、かつ、発せられた蛍光を光の反射体を利用して効率よく検出することができる。ここでは、384ウェルを例にとって説明したが、上記発明は、1536ウェルや9600ウェルなど、様々なマイクロウェルアレイに適応可能であることは自明である。

表 1

		ゲノム DNA	ウェルの 容積	混合した Invader 法試薬	4時間後 の蛍光強 度	溶着時 間	発振 加圧	図
		ng/well	$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$ /well	(相対値)	sec	N/cm	
実施例 1	マイクロ ウェルア レイ	10	0.9	1.6	43	0.25	50	図 1 相当
実施例 2		20	0.9	1.6	91	0.25	50	図 1 相当
実施例 3		40	0.9	1.6	190	0.25	50	図 1 相当
実施例 4		40	0.9	1.6	205	0.05	50	図 1 相当、溶着時間
実施例 5		40	0.9	1.6	165	0.8	50	図 1 相当、溶着時間
実施例 6		40	0.9	1.6	211	0.25	0.3	図 1 相当、発振加圧
実施例 7		40	0.9	1.6	195	0.25	100	図 1 相当、発振加圧
実施例 8		40	0.9	1.6	375	0.25	50	図 1 相当 + 反射体
実施例 9		40	0.1	0.2	41	0.25	50	図 1 相当
実施例 10		10	1.1	1.6	48	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 11		20	1.1	1.6	100	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 12		40	1.1	1.6	212	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 13		10	1.1	2.0	46	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 14		20	1.1	2.0	102	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 15		40	1.1	2.0	220	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 16		10	1.4	2.0	43	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 17		20	1.4	2.0	92	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 18		40	1.4	2.0	189	0.25	50	図 1 4 + 図 1 7 相当
実施例 19		10	0.9	1.6	46	0.25	50	図 1 相当 TaqMan 法
比較例 1	マイクロ ウェルア レイ	40	0.9	1.6	2	0.9	50	図 1 相当
比較例 2		40	0.9	1.6	0	0.25	0.1	図 1 相当
比較例 3		40	0.02	0.2	0	0.25	50	図 1 相当
比較例 4	マイクロ タイター プレート	10	40	20	5			
比較例 5		20	40	20	11			
比較例 6		40	40	20	23			
比較例 7		100	40	20	53			
比較例 8		20	40	40	4			
比較例 9		40	40	40	13			
比較例 10		100	40	40	27			
比較例 11		10	40	20	6			TaqMan 法

表 2

	ウェルの 容積	分注した 水の体積	ホーンの 振幅	溶着時間	発振加圧	全加圧	溶着後のウ ェル内水量 (結果)	図
	$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$	$\mu\text{m}$	sec	N/cm	N	$\mu\text{L}$	
実施例 2 0	0.9	1.0	30	0.25	50	10,000	0.9	図 1 相当
実施例 2 1	0.9	1.0	40	0.25	50	10,000	0.9	図 1 相当
比較例 1 2	0.9	1.0	28	0.25	50	10,000	溶着不良	図 1 相当
比較例 1 3	0.9	1.0	42	0.25	50	10,000	0.0	図 1 相当

図 2 5 ないし 3 4 は、本発明に基づくマイクロウェルアレイの 1 つの実施例を示す図面である。図 1 5 に示すように、当該マイクロウェルアレイは、概略平板状であり、上面にマイクロウェルが X Y 方向に規則的に配列されている。図面上カバーは透明なカバーであるとして示したが、必ずしも透明である必要はない。ただし、少なくともカバーと本体の内的一方が光透過性の材料からなっていれば、発光検出のためには好ましい。図 2 6 は、図 2 5 に示したマイクロウェルアレイの 1 つの実施例を上から見た様子を示す図面である。図から明らかなように、この実施例では 3 8 4 個のマイクロウェルが形成されており、本体のマイクロウェル相互間には溝を形成してマイクロウェルからの溢水を収容してクロスコンタミネーションを防止する構造である。図 2 7 と 2 8 は、図 2 5 に示したマイクロウェルアレイの側面図である。マイクロ植えるアレイの強度確保と、重ねて保持する際の便宜等を考慮してマイクロウェルアレイは一定の高さを有するが、当該高さは周囲の垂直壁によって定められており、周辺部以外の下部は中空であることがわかる。図 2 9 は、マイクロウェルアレイをしたからみた底面図である。

図 3 0 には、図 2 5 に示したマイクロウェルアレイの図中 A A で示す部分の断面図を示す。本体とカバーが重なり合っている様子と、本体中央部の下部が中空である様子が示されている。図 3 1 は、図 2 5 において B B で示す部分の断面図であるが、カバーに設けた突起を本体に設けた貫通孔に貫入させることによって相互に位置決めされる様子が示されている。図 3 2 は、図 3 0 において C C で示した部分の拡大断面図である。マイクロウェルアレイ周囲に形成された隆起部と、カバーに形成された突起部相互の位置関係が明瞭に示されている。図 3 3 は、図 2 5 に示したマイクロウェルアレイのカバーの下面を示す図面である。本実施例の場合には、各マイクロウェルに対応する位置に突起が形成されている。当該カバーを側方からみた状態を示したものが図 3 4 である。

図 3 5 は、3 8 4 個のマイクロウェルを形成した点においては前出の実施例と同じであるが、

マイクロウェル相互間に溝のない本発明の他の実施例を示す斜視図である。図36および図37から明らかなように、本体に溝が形成されていない点において前出の実施例と異なるが、その他の点においては前出の実施例と同一である。

図38は、96個のマイクロウェルを形成したさらに別の実施例に係るマイクロウェルアレイを示す斜視図である。縦横の寸法等、外形は前出の実施例と同じであり、本体に形成されたマイクロウェルの大きさと個数のみが異なっている。形状および外形を規格化することによって、マイクロウェルアレイを取り扱うための種々の装置を共通化を通じて、作業効率の向上に寄与することができる。

図39は、前出の実施例とは逆にマイクロウェルを非常に多数形成したマイクロウェルアレイの実施例を示すものである。この場合にも形状および外形を規格化することによって作業効率を向上させることができる点は前述の通りであるが、必ずしも図に示した形状に限定する必要がないことは自明である。

前出の図面は、本発明に基づくマイクロウェルアレイの具体的なイメージを説明するために現実的な形状を比較的忠実に図示したものであるが、本発明の技術的思想を実現するためには、必ずしも前出のような形状をとる必要はなく、前出の形状以外にも多くのバリエーションが可能なのは当業者には自明である。したがって、本発明の特許権の範囲には、特許請求の範囲に記載された特徴を有するこれら多くのバリエーションと、さらにそれらの均等物とが含まれる。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、溶着後のウェルの容積にほぼ等しい量、あるいは、それを超える量の液体をウェルにスポットし、液体がウェルの容積よりも多ければその余分の液体をカバー、中間体によって、ウェルから押し出し、空気がウェル内にほとんど残存しないように液体を密閉し、信号となる蛍光を効率的に検出することが可能である。

## 請求の範囲

1. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、各々のウェルの縁部近傍は、周囲よりも高くなった隆起部を形成していることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
2. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、各々のウェルの縁部近傍は、周囲よりも高くなった溶着用隆起部を形成していることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
3. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、カバーの、カバーで容器を覆ったときに各ウェルの縁部近傍に対応する位置には、周囲よりも高くなった隆起部を形成していることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
4. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、カバーの、カバーで容器を覆ったときに各ウェルの縁部近傍に対応する位置には、周囲よりも高くなった溶着用隆起部を形成していることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
5. 前記隆起部は環状であってその頂部の断面は凸状であることを特徴とする請求項 1 ないし 4 に記載されたマイクロウェルアレイ。
6. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、各々のウェルの周囲またはカバーの当該ウェルの周囲に相当する位置の少なくとも一方には、ウェルをカバーによって覆った際にウェルから溢れた液の少なくとも一部を収容することができる溝が形成されていることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
7. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備し、該カバーと液体の入った該ウェルとがウェルごとに溶着されていることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
8. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備し、該カバーと液体の入った該ウェルとがウェルごとに超音波溶着されていることを特徴とするマイクロウェルアレイ。
9. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該容器と該カバーの実質的な厚みがいずれも、該容器と該カバーに接触する液体の熱をウェル内に伝導することができる厚さであることを特徴と

するマイクロウェルアレイ。

10. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備し、該容器と該カバーの実質的な厚みがいずれも0.15～3.0mmの範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

11. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した状態でのマイクロウェルアレイの実質的な厚みが0.3～4.0mmの範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

12. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に溶着した状態でのウェルを直接定義する部分の肉厚が、0.05～0.4mmの範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

13. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェル近傍には、該ウェルと該カバーを溶着するのに必要な体積を有する溶接用リブが設けられていることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

14. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェル近傍には、断面形状が三角形の溶接用リブが設けられていることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

15. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェル近傍の溶着用リブの底辺の肉厚が0.2～1.0mmの範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

16. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェル近傍の溶着用リブの底辺が0.2～1.0mmの範囲、高さが0.2～0.8mmの範囲、該ウェルを取り囲むリブの直径が0.5～4.0mmの範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

17. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うとともに、該ウェルのそれぞれを液密に密閉するカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に接合したウェルを取り囲む溶着部分の幅が、0.3～2.5mmの範囲で



あることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

18. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該マイクロウェルアレイが恒温槽中に浸漬された際、該ウェル内の液体温度が数分以内に均一になるような容積を該ウェルが有することを特徴とするマイクロウェルアレイ。

19. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェルの容積が0.1～1.4  $\mu\text{l}$ の範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

20. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備し、該ウェルと該カバーとをウェルごとに液密に接合した後のウェルの容積が0.1～1.4  $\mu\text{l}$ の範囲であることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

21. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備し、該ウェルと該カバーとは各ウェルを液密に密閉しており、ウェル内部で液体が沸騰しても、ウェルの密閉性が保持されることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

22. 前記ウェルの密閉性は前記ウェルと前記カバーとを超音波溶着して得られたものであることを特徴とする請求項16に記載のマイクロウェルアレイ。

23. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備し、該ウェルと該カバーとは各ウェルを液密に密閉しており、ウェル内部で液体が沸騰しても、外部から機械的な力を加えることなくウェルの密閉性が維持できることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

24. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備し、該ウェルと該カバーとは各ウェルを液密に密閉しておりウェル内部で、90～100℃に加熱された液体が沸騰しても、ウェルごとの密閉性を維持することができることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

25. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うカバーを具備したマイクロウェルアレイにおいて、該ウェルと該カバーとは各ウェルを液密に密閉しており、該マイクロウェルアレイを沸騰した液中に浸漬させても、ウェルごとの密閉性を維持することができることを特徴とするマイクロウェルアレイ。

26. さらに、ほぼ平板状で可撓性を有する材料からなる中間体を容器とカバーの間に介在さ

せたことを特徴とする請求項 1 ないし 25 のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

27. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーとを具備し、カバーの、ウェルにカバーで容器を覆ったときに各ウェルに対応する位置には、ウェルをカバーによって封止した際に、各ウェル内に押し込まれる凸部が形成されていることを特徴とする請求項 1 ないし 26 のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

28. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器のウェルに液体を注入し、容器を覆うようにカバーを被せ、容器とカバーを密着させるように押圧力を加えて、次に、当該押圧力を維持しながら超音波を照射することによって、該容器のウェルに入った液体がウェルから弾き出されることがないように該ウェルと該カバーとを、ウェル毎に超音波溶着することを特徴とする液体の密閉方法。

29. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを用い、ウェルに液を注入し、カバーを容器に押し付けた後、該カバーと該容器を溶接することにより該液体を各ウェルに封止することを特徴とする液体の密閉方法。

30. 前記の液は、DNA またはたんぱく質を含む液であることを特徴とする請求項 28 ないし 29 に記載の方法。

31. 前記溶接は超音波溶着によって行うことを特徴とする請求項 29 ないし 30 のいずれかに記載の液体の密閉方法。

32. 前記超音波溶着のために照射される超音波は、前記ウェルに封入された DNA またはたんぱく質を実質的に損傷させないものであることを特徴とする請求項 28 または 31 に記載の方法。

33. 該容器のウェルと該カバーを、0.05 から 0.8 秒の間、超音波振動により溶着することで、液密に封止することを特徴とする請求項 28 または 31 に記載された液体の密閉方法。

34. 前記溶接を行う際、溶融する隆起部の長さ 1 cm あたり、0.3 ないし 100 N の力を加えつつ、超音波ホーンの振動を開始することを特徴とする請求項 28、31 または 32 のいずれかに記載の液体の密閉方法。

35. 該容器と該カバーとが各ウェルごとに超音波溶着によってウェルの封止を行うことができる材料からなることを特徴とする請求項 1 ないし 27 のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

36. 各ウェルの裏面が平面状であることを特徴とする請求項 1 ないし 27 および 35 のい

れかに記載されたマイクロウェルアレイ。

37. 前記ウェルの下または上に、光を反射する反射面が設けられていることを特徴とする請求項1ないし27および35、36のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

38. 前記請求項1ないし27、および、35ないし37のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイを用い、先に接触式の分注機により液体を分注し、その後非接触式の分注機により液体を分注することを特徴とする液体の分注方法。

39. 先に接触式の分注機によりウェルごとに異なる液体を分注し、その後非接触式の分注機により液体を分注することを特徴とする請求項38に記載された液体の分注方法。

40. 先に接触式の分注機により液体を分注し、その液体を乾燥させ、その後非接触式の分注機により液体を分注することを特徴とする請求項38または39のいずれかに記載された液体の分注方法。

41. 各ウェルの水平断面が円形であることを特徴とする前記請求項1ないし27、および、35ないし37のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

42. 前記マイクロウェルアレイの外周部に沿ってスカート部を形成したことを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

43. 前記マイクロウェルアレイに形成されたスカート部の角に、貫通穴を形成したことを特徴とする請求項42に記載されたマイクロウェルアレイ。

44. 該容器と該カバーには挿入部と受け部が形成され、挿入部を受け部にはめ込むことによって該容器と該カバーに係止することができることを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし43のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

45. 前記容器及び前記カバーがプラスチック材料から形成されることを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし44のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

46. 前記容器と前記カバーが、メチルペンテンコポリマーあるいはポリカーボネートから構成されることを特徴する請求項45に記載されたマイクロウェルアレイ。

47. 前記容器と前記カバーの少なくとも一方が、光学的に透明な材料で形成されていることを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし46のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

48. 前記容器のウェルあるいは前記カバーのウェル側の表面に、液状の試薬または検体を分

注し、担持させたことを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし47のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

49. 前記容器のウェルあるいは前記カバーのウェル側の表面に、液状の試薬または検体を非接触式の分注機により分注し、担持させたことを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし49のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

50. 試薬または検体の少なくとも一方を前記容器のウェルに担持させ、他の一方をカバー表面に担持させ、前記ウェルと前記カバーを超音波溶着して接合し、各ウェルごとに試薬と検体を反応させるようにしたことを特徴とする前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし49のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイの使用方法。

51. 前記請求項1ないし27、35ないし37、41ないし50のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイの製造方法であって、サイドゲートから樹脂を流し込んで該容器と該カバーを射出成形することを特徴とする製造方法。

52. 超音波溶着装置において、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、かつ、最大発振出力が4.1～5.0kWであることを特徴とする超音波溶着装置。

53. 超音波溶着装置において、ホーンの振幅が30～40ミクロン、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、かつ、最大発振出力が4.1～5.0kWであることを特徴とする超音波溶着装置。

54. ホーンの振幅が30～40ミクロン、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、最大発振出力が4.1～5.0kW、溶着時間が0.05～0.8秒の時間内で超音波を照射することができることを特徴とする超音波溶着装置。

55. ホーンの振幅が30～40ミクロン、発振時の力として7000～23000Nの力を加えることができ、かつ、最大発振出力が4.1～5.0kWある超音波溶着装置により、前記請求項1ないし23、31ないし33、37ないし46のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイを、0.05～0.8秒の時間内でウェルごとに溶着することを特徴とする密閉方法及び密閉することができる超音波溶着装置。

56. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに液密に溶着することを特徴とする密閉・分注方法。

57. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、ウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとの反応の度合いを解析することを特徴とする解析方法。

58. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、ウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとに遺伝子を解析することを特徴とする遺伝子の解析方法。

59. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、ウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとに遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の多型解析方法。

60. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、そのマイクロウェルアレイに分注する試薬及び検体に対応したバーコードを添付して、工程ごとに、または、マイクロウェルアレイごとに進捗をバーコードで管理できるようにし、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、ウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとの反応の度合い、遺伝子、および遺伝子の多型の内の少なくともいずれか1つを解析することを特徴とする解析方法。

61. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該ウェルにそれぞれ異なるDNAを分注し、次に試薬を複数の該ウェルに分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬とDNAを反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする遺伝子の多型解析方法。

62. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバー

を具備したマイクロウェルアレイを用いて、複数の該ウェルに試薬を分注し、次に該ウェルにそれぞれ異なる DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする遺伝子の多型解析方法。

6 3. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該カバー表面に試薬を分注し、次に該ウェルにそれぞれ異なる DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする遺伝子の多型解析方法。

6 4. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該カバー表面にそれぞれ異なる試薬を分注し、次に該ウェルに DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の診断方法。

6 5. 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該ウェルにそれぞれ異なる試薬を分注し、次に該ウェルに DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の診断方法。

## 補正書の請求の範囲

[2002年2月18日(18.02.02)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲  
1-65は補正された請求の範囲1-63に置き換えられた。(7頁)]

- 1 (補正後). 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことのできるカバーを具備し、ウェルに液体が注入された状態で、カバーが容器に接合されてなるマイクロウェルアレイ。
- 2 (補正後). 各々のウェルの縁部近傍、またはカバーの、カバーで容器を覆ったときに各ウェルの縁部近傍に対応する位置には、接合前において周囲よりも高くなった隆起部が形成されていることを特徴とする請求項1に記載のマイクロウェルアレイ。
- 3 (補正後). 前記隆起部が溶着用隆起部であることを特徴とする請求項2に記載のマイクロウェルアレイ。
- 4 (補正後). 前記隆起部は環状であってその頂部の断面は凸状であることを特徴とする請求項2または3に記載のマイクロウェルアレイ。
- 5 (補正後). 各々のウェルの周囲またはカバーの当該ウェルの周囲に相当する位置の少なくとも一方には、ウェルをカバーによって覆った際にウェルから溢れた液の少なくとも一部を収容することができる溝が形成されていることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。
- 6 (補正後). カバーと液体の入ったウェルとがウェルごとに接合されていることを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。
- 7 (補正後). 接合が超音波溶着によりなされていることを特徴とする請求項1ないし6のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。
- 8 (補正後). カバーがウェルのそれぞれを液密に密閉するもので、容器とカバーの実質的な厚みがいずれも、該容器と該カバーに接触する液体の熱をウェル内に伝導することができる厚さであることを特徴とする請求項1ないし7のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。
- 9 (補正後). 容器とカバーの実質的な厚みがいずれも0.15~3.0mmの範囲であることを特徴とする請求項8に記載のマイクロウェルアレイ。
- 10 (補正後). ウェルとカバーとをウェルごとに液密に接合した状態でのマイクロウェルアレイの実質的な厚みが0.3~4.0mmの範囲であることを特徴とする請求項1ないし9のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

11 (補正後). ウェルとカバーとをウェルごとに液密に接合した状態でのウェルを直接定義する部分の肉厚が、0.05～0.4mmの範囲であることを特徴とする請求項1ないし10のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

12 (補正後). カバーがウェルのそれぞれを液密に密閉するもので、ウェル近傍に、該ウェルと該カバーを接合するのに必要な体積を有する溶接用リブが設けられていることを特徴とする請求項1ないし11のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

13 (補正後). 溶接用リブが断面三角形形状であることを特徴とする請求項12に記載のマイクロウェルアレイ。

14 (補正後). 溶接用リブの底辺の肉厚が 0.2～1.0mmの範囲であることを特徴とする請求項12または13に記載のマイクロウェルアレイ。

15 (補正後). 溶接用リブの底辺が 0.2～1.0mmの範囲、高さが 0.2～0.8mmの範囲、該ウェルを取り囲むリブの直径が 0.5～4.0mmの範囲であることを特徴とする12ないし14のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

16 (補正後). カバーがウェルのそれぞれを液密に密閉するもので、ウェルとカバーとをウェルごとに液密に接合したウェルを取り囲む接合部分の幅が、0.3～2.5mmの範囲であることを特徴とする請求項1ないし15のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

17 (補正後). マイクロウェルアレイが恒温槽中に浸漬された際、ウェル内の液体温度が数分以内に均一になるような容積を該ウェルが有することを特徴とする請求項1ないし16のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

18 (補正後). ウェルの容積が 0.1～1.4  $\mu$ lの範囲であることを特徴とする請求項17に記載のマイクロウェルアレイ。

19 (補正後). ウェルとカバーとをウェルごとに液密に接合した後のウェルの容積が 0.1～1.4  $\mu$ lの範囲であることを特徴とする請求項1ないし18のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

20 (補正後). カバーがウェルのそれぞれを液密に密閉するもので、ウェル内部で液体が沸騰しても、ウェルの密閉性が保持されることを特徴とする請求項1ないし19のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

21 (補正後). 外部から機械的な力を加えることなくウェルの密閉性が維持できることを特徴とする請求項20に記載のマイクロウェルアレイ。



22 (補正後). 前記ウェルの密閉性は前記ウェルと前記カバーとを超音波溶着して得られたものであることを特徴とする請求項20または21に記載のマイクロウェルアレイ。

23 (補正後). ウェル内部で、90～100℃に加熱された液体が沸騰しても、ウェルごとの密閉性を維持することができることを特徴とする請求項20ないし22のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

24 (補正後). マイクロウェルアレイを沸騰した液中に浸漬させても、ウェルごとの密閉性を維持することができることを特徴とする請求項20ないし23のいずれかに記載のマイクロウェルアレイ。

25 (補正後). ほぼ平板状で可撓性を有する材料からなる中間体を容器とカバーの間に介在させたことを特徴とする請求項1ないし24のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

26 (補正後). カバーの、ウェルにカバーで容器を覆ったときに各ウェルに対応する位置には、ウェルをカバーによって封止した際に、各ウェル内に押し込まれる凸部が形成されていることを特徴とする請求項1ないし25のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

27 (補正後). 該容器と該カバーとが各ウェルごとに超音波溶着によってウェルの封止を行うことができる材料からなることを特徴とする請求項1ないし26のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

28 (補正後). 各ウェルの裏面が平面状であることを特徴とする請求項1ないし27のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

29 (補正後). 各ウェルの水平断面が円形であることを特徴とする前記請求項1ないし28のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

30 (補正後). 前記マイクロウェルアレイの外周部に沿ってスカート部を形成したことを特徴とする請求項1ないし29のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

31 (補正後). 前記マイクロウェルアレイに形成されたスカート部の角に、貫通穴を形成したことを特徴とする請求項30に記載されたマイクロウェルアレイ。

32 (補正後). 該容器と該カバーには挿入部と受け部が形成され、挿入部を受け部にはめ込むことによって該容器と該カバーを係止することができることを特徴とする請求項1ないし31のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

33 (補正後). 前記容器及び前記カバーがプラスチック材料から形成されることを特徴とする請求項1ないし32のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

34 (補正後). 前記容器と前記カバーが、メチルペンテンコポリマーあるいはポリカーボネートから構成されることを特徴する請求項33に記載されたマイクロウェルアレイ。

35 (補正後). 前記容器と前記カバーの少なくとも一方が、光学的に透明な材料で形成されていることを特徴とする前記請求項1ないし34のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

36 (補正後). 前記ウェルの下または上に、光を反射する反射面が設けられていることを特徴とする請求項1ないし35のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

37 (補正後). 前記容器のウェルあるいは前記カバーのウェル側の表面に、液状の試薬または検体を分注し、担持させたことを特徴とする請求項1ないし36のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

38 (補正後). 前記容器のウェルあるいは前記カバーのウェル側の表面に、液状の試薬または検体非接触式の分注機により分注し、担持させたことを特徴とする請求項1ないし37のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

39 (補正後). 前記液体がDNAまたはタンパク質を含む液であることを特徴とする請求項1ないし38のいずれかに記載されたマイクロウェルアレイ。

40 (補正後). 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを形成し、ウェルに液を注入し、カバーを容器に押し付けて、該カバーと該容器を接合して液を各ウェルに封止することを特徴とするマイクロウェルアレイの製造方法。

41 (補正後). 前記接合は超音波溶接装置を用いる超音波溶接によって行うことを特徴とする請求項40に記載の製造方法。

42 (補正後). 容器のウェルに液を注入し、容器を覆うようにカバーを被せ、容器とカバーを密着させるように押圧力を加えて、次に、当該押圧力を維持しながら超音波を照射することによって、該容器のウェルに入った液がウェルから弾き出されることがないように該ウェルと該カバーとを、ウェル毎に超音波溶接することを特徴とする請求項40または41に記載の製造方法。

43 (補正後). 前記の液は、DNAまたはたんぱく質を含む液であることを特徴とする

請求項 4 0 ないし 4 2 のいずれかに記載の製造方法。

4 4 (補正後). 前記超音波溶接のために照射される超音波は、前記ウェルに封入された DNA またはたんぱく質を実質的に損傷させないものであることを特徴とする請求項 4 3 に記載の製造方法。

4 5 (補正後). 容器のウェルとカバーを、0.05 から 0.8 秒の間、超音波振動により溶着することで、液密に封止することを特徴とする請求項 4 0 ないし 4 4 のいずれかに記載された製造方法。

4 6 (補正後). 前記溶接を行う際、溶融部の長さ 1 cm あたり、0.3 ないし 100 N の力を加えつつ、超音波ホーンの振動を開始することを特徴とする請求項 4 0 ないし 4 5 のいずれかに記載の製造方法。

4 7 (補正後). 先に接触式の分注機により液体を分注し、その後非接触式の分注機により液体を分注することを特徴とする請求項 4 0 ないし 4 6 のいずれかに記載の製造方法。

4 8 (補正後). 先に接触式の分注機によりウェルごとに異なる液体を分注し、その後非接触式の分注機により液体を分注することを特徴とする請求項 4 7 に記載の製造方法。

4 9 (補正後). 先に接触式の分注機により液体を分注し、その液体を乾燥させ、その後非接触式の分注機により液体を分注することを特徴とする請求項 4 7 または 4 8 に記載の製造方法。

5 0 (補正後). サイドゲートから樹脂を流し込んで容器とカバーを射出成形することを特徴とする請求項 4 0 ないし 4 9 のいずれかに記載の製造方法。

5 1 (補正後). 試薬または検体を、ウェル内部あるいはカバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに液密に溶着することを特徴とする請求項 4 0 ないし 5 0 のいずれかに記載の製造方法。

5 2 (補正後). 試薬または検体の少なくとも一方を前記容器のウェルに担持させ、他の一方をカバー表面に担持させ、前記ウェルと前記カバーを超音波溶着して接合し、各ウェルごとに試薬と検体を反応させるようにしたことを特徴とする請求項 4 0 ないし 5 0 のいずれかに記載の製造方法。

5 3 (補正後). マイクロウェルアレイの製造に使用される超音波溶着装置において、発振時の力として 7000 ~ 23000 N の力を加えることが可能な加圧機構を具備し、かつ、4.1 ~ 5.0 kW の最大発振出力を有することを特徴とする超音波溶着装置。

54 (補正後). ホーンの振幅が30～40ミクロンであることを特徴とする請求項53に記載の超音波溶着装置。

55 (補正後). 溶着時間が0.05～0.8秒の時間内で超音波を照射することができることを特徴とする請求項54に記載の超音波溶着装置。

56 (補正後). 0.05～0.8秒の時間内でウェルごとに溶着することを特徴とする請求項53ないし55のいずれかに記載の超音波溶着装置。

57 (補正後). 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイに、試薬または検体を、該ウェル内部あるいは該カバー表面に分注し、その後該カバーと該ウェルをウェルごとに溶着し、試薬と検体を反応させた後、あるいは試薬と検体を反応させながら、ウェルごとの蛍光強度を分析することにより、ウェルごとに反応の度合いまたは遺伝子を解析することを特徴とする解析方法。

58 (補正後). 遺伝子の多型を解析することを特徴とする請求項57に記載の解析方法。

59 (補正後). マイクロウェルアレイに、そのマイクロウェルアレイに分注する試薬及び検体に対応したバーコードを添付して、工程ごとに、または、マイクロウェルアレイごとに進捗をバーコードで管理できるようにすることを特徴とする請求項57または58に記載の解析方法。

60 (補正後). ウェルにそれぞれ異なるDNAを分注し、次に試薬を複数の該ウェルに分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬とDNAを反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする請求項57ないし59のいずれかに記載の解析方法。

61 (補正後). 複数のウェルに試薬を分注し、次に該ウェルにそれぞれ異なるDNAを分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬とDNAを反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする請求項57ないし59のいずれかに記載の解析方法。

62 (補正後). 該カバー表面に試薬を分注し、次に該ウェルにそれぞれ異なるDNAを分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬とDNAを反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、多型のタイピングを行うことを特徴とする請求項57ないし59のいずれかに記載の解析方法。

6 3 (補正後). 複数の独立したウェルがアレイ状に配置された容器と、容器を覆うことができるカバーを具備したマイクロウェルアレイを用いて、該カバー表面または該ウェルの何れか一方にそれぞれ異なる試薬を分注し、次に該ウェルに DNA を分注し、該ウェルと該カバーとを溶着させた後、試薬と DNA を反応させ、その後各ウェルの蛍光強度を分析することにより、遺伝子の多型を解析することを特徴とする遺伝子の診断方法。

## 条約 19 条に基づく説明書

請求の範囲第 1 項は、ウェルに液体が注入された状態で、カバーが容器に接合されていることを特徴とするように補正したもので、新規に追加したものであるが、当初の請求項 29、請求項 7 など、また明細書全体を通じて読み取ることができる事項であり、出願時における国際出願の開示の範囲にあるものである。

請求の範囲第 2 項は、国際出願時の請求の範囲第 1 項と第 3 項を一つにしたもの、請求の範囲第 3 項は、国際出願時の請求の範囲第 2 項と第 4 項を一つにしたものである。

請求の範囲第 4 項は、国際出願時の請求の範囲第 5 項に対応し、

請求の範囲第 5 項～第 20 項は、それぞれ国際出願時の請求の範囲第 6 項～第 21 項を独立形式から従属形式に補正したものである。

請求の範囲第 21 項、第 22 項は、それぞれ国際出願時の請求の範囲第 23 項、第 22 項を独立形式から従属形式に補正したものである。

請求の範囲第 23 項～第 26 項は、それぞれ国際出願時の請求の範囲第 24 項～第 27 項を独立形式から従属形式に補正したものである。

請求の範囲第 27 項～第 38 項は、それぞれ国際出願時の請求の範囲第 35 項～第 36 項、第 41 項～第 47 項、第 37 項、第 48 項、第 49 項にそれぞれ対応する。

請求の範囲第 39 項は新たに追加したものである。

請求の範囲第 40 項～第 52 項は、それぞれ国際出願時の請求の範囲第 29 項、第 31 項、第 28 項、第 30 項、第 32 項～第 34 項、第 38 項～第 39 項、第 40 項、第 51 項、第 56 項、第 50 項にそれぞれ対応するもので、液体の密閉方法、液体の分注方法等の記載形式をマイクロウェルアレイの製造方法に補正したものである。

請求の範囲第 53 項は、国際出願時の請求の範囲第 52 項を補正したものである。

請求の範囲第 54 項～第 56 項は、国際出願時の請求の範囲第 53 項～第 55 項を独立形式から従属形式に補正したものである。

請求の範囲第 57 項は、国際出願時の請求の範囲第 57 項、第 58 項を一つにしたものである。

請求の範囲第 58 項～第 62 項は、それぞれ国際出願時の請求の範囲第 59 項～第 63 項を従属形式に補正したものである。

請求の範囲第 63 項は、国際出願時の請求の範囲第 64 項及び第 65 項を一つにまとめたものである。

図 1

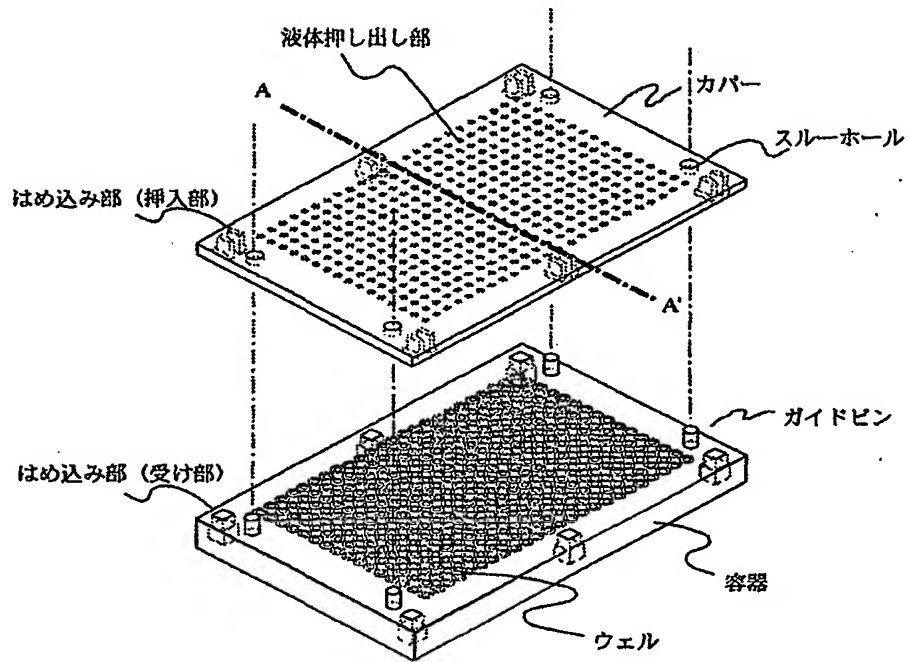


図 2

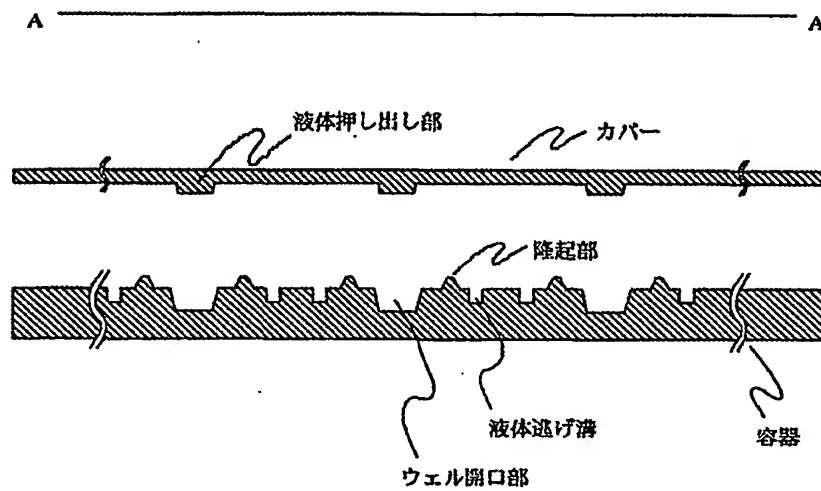


図 3

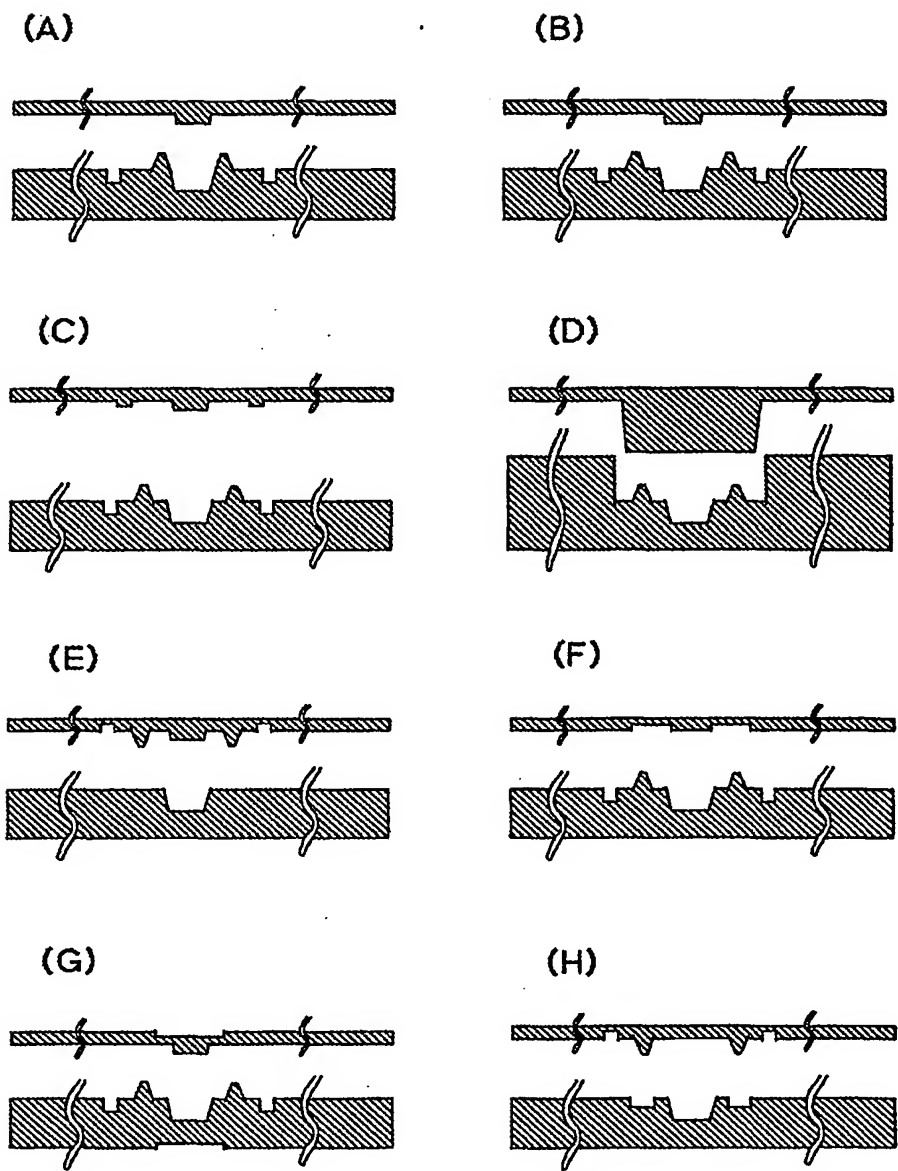




図 4

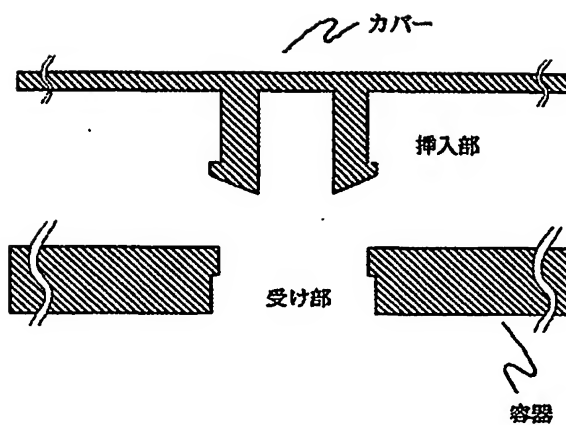


図 5

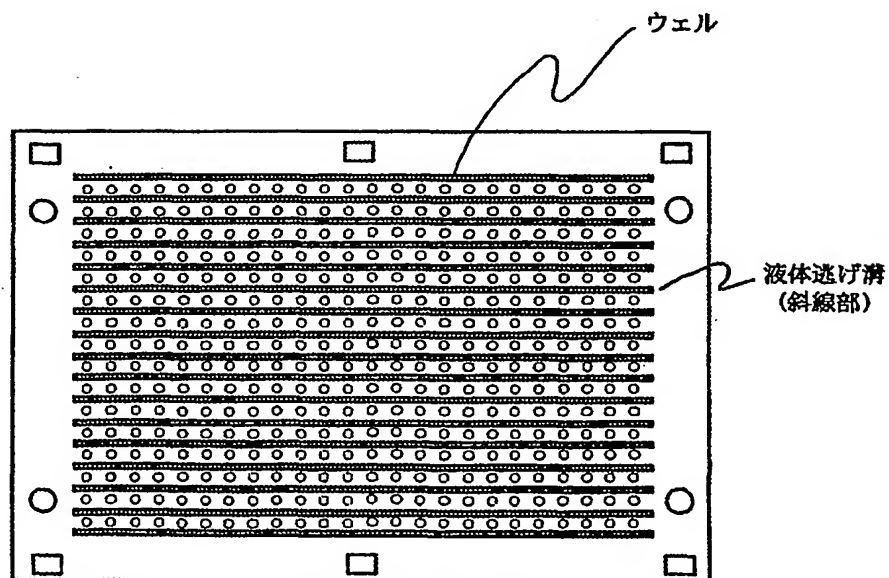


図 6

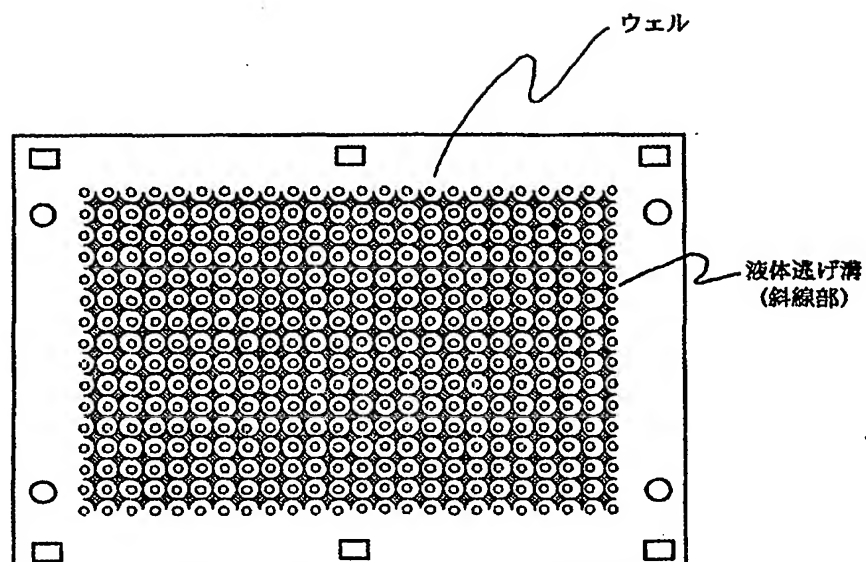


図 7

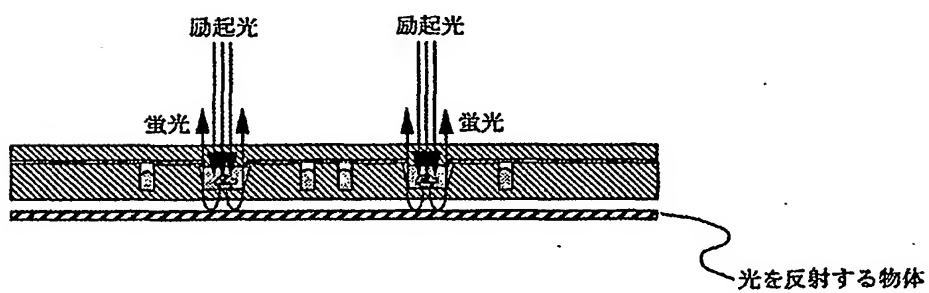
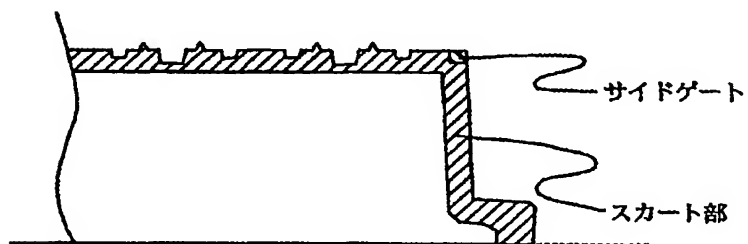
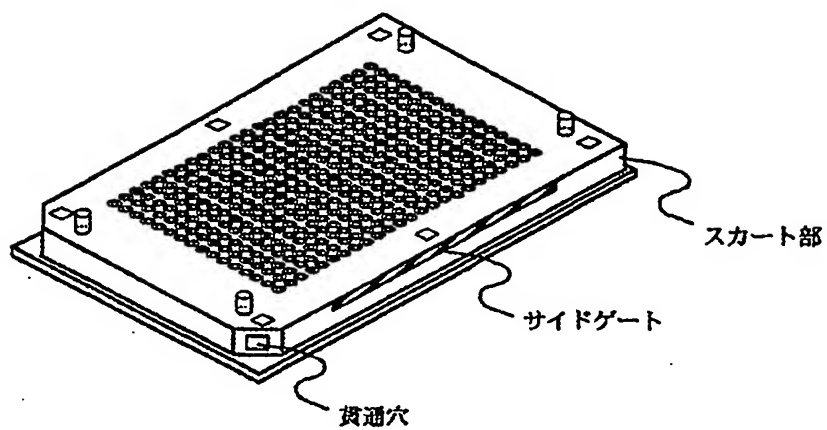


図 8



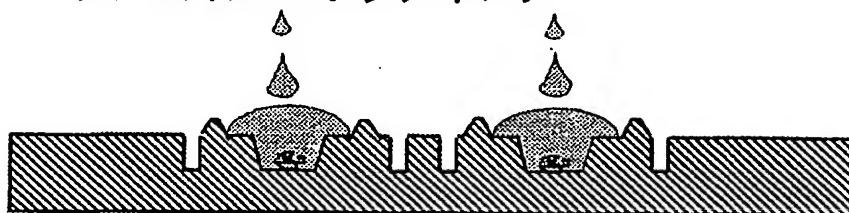
6/26

図 9

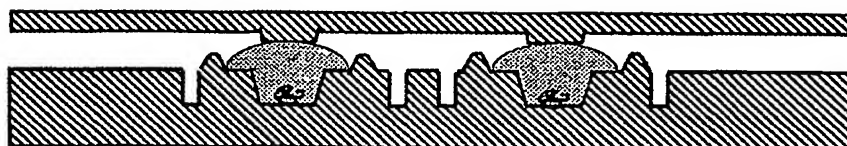
## (A) ゲノム DNA のスポットティング



## (B) 試薬のスポットティング



## (C) カバーの設置



## (D) カバーの押し当て



## (E) 超音波溶着



7/26

図 10

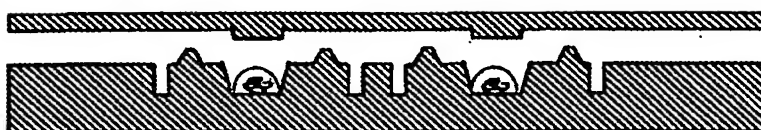
(A) ゲノム DNA のスポッティング



(B) 試薬のスポッティング



(C) カバーの設置

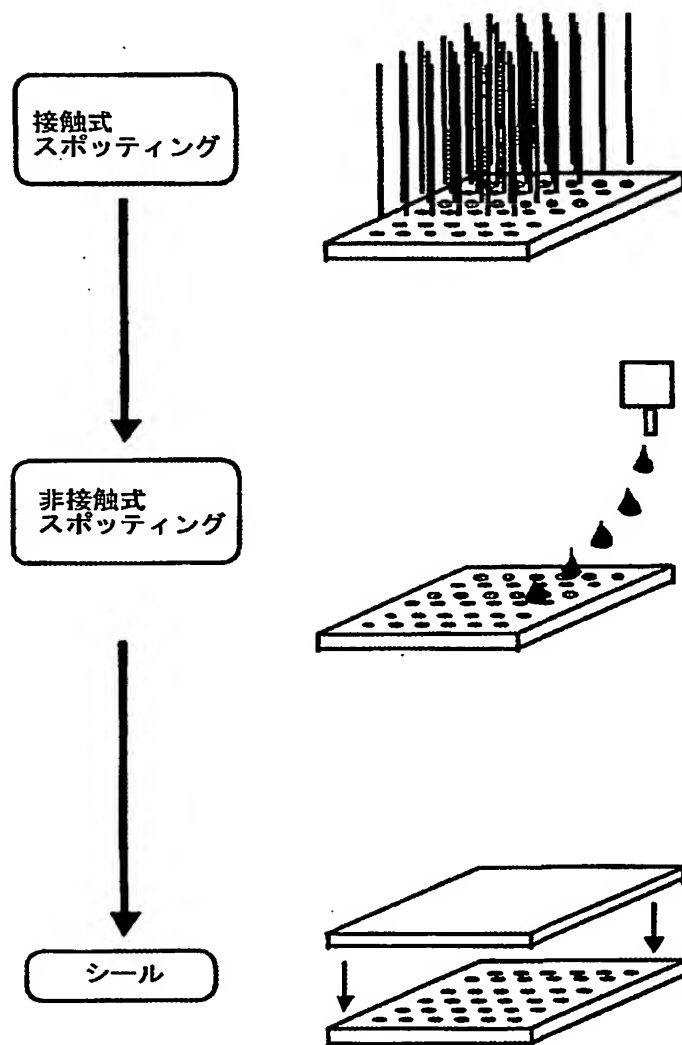


(D) カバーの押し当て



(E) 超音波溶着





9/26

図 1 2

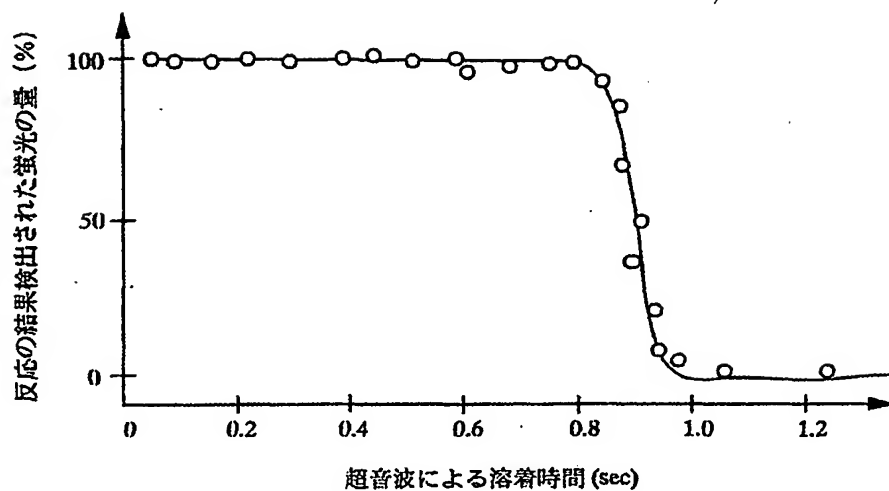
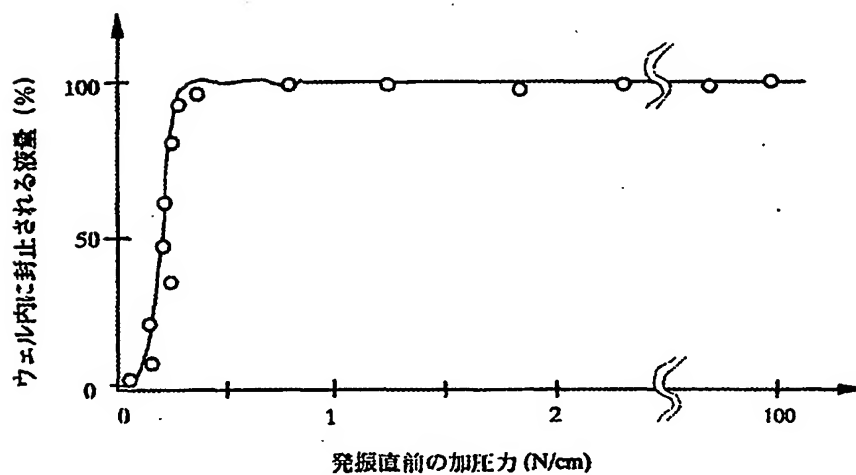
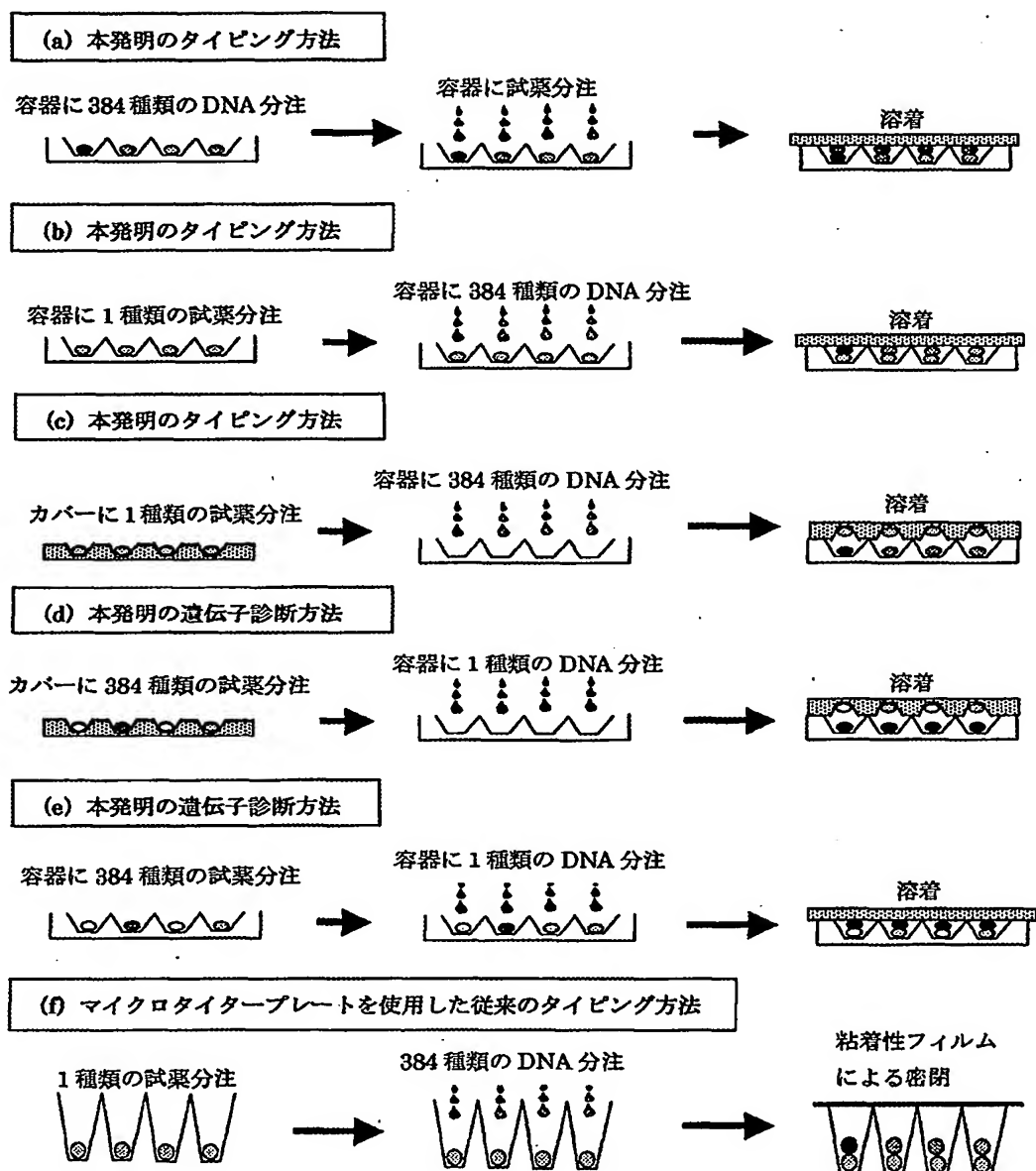


図 1 3



10/26

図 1 4





11/26

図 15

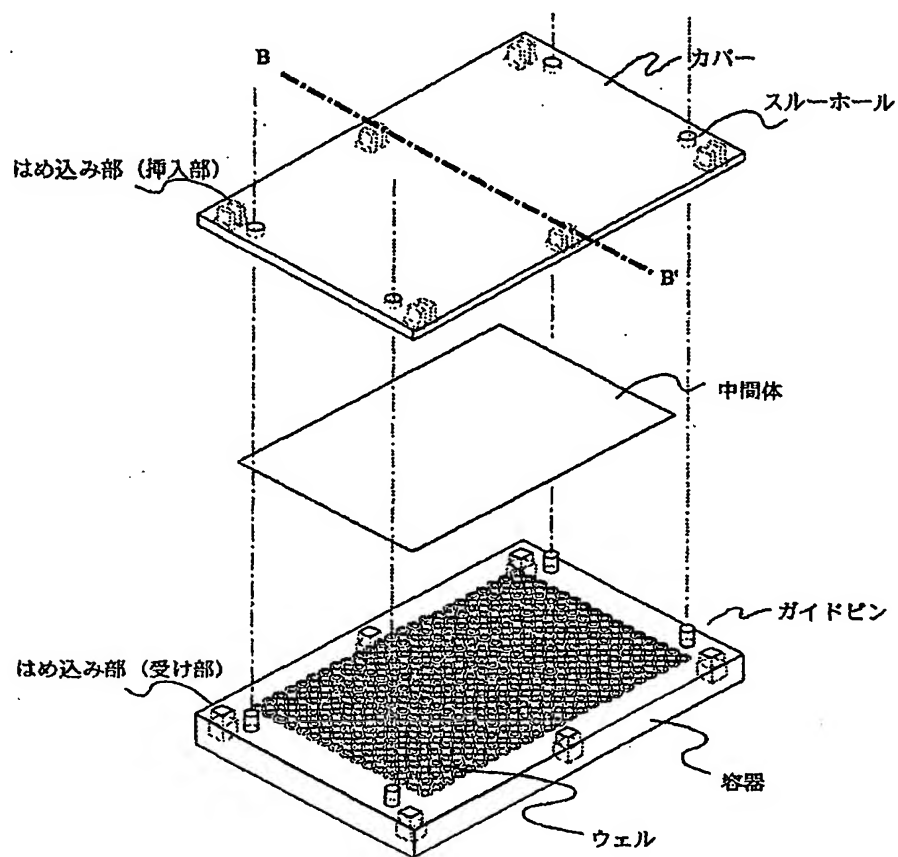


図 16

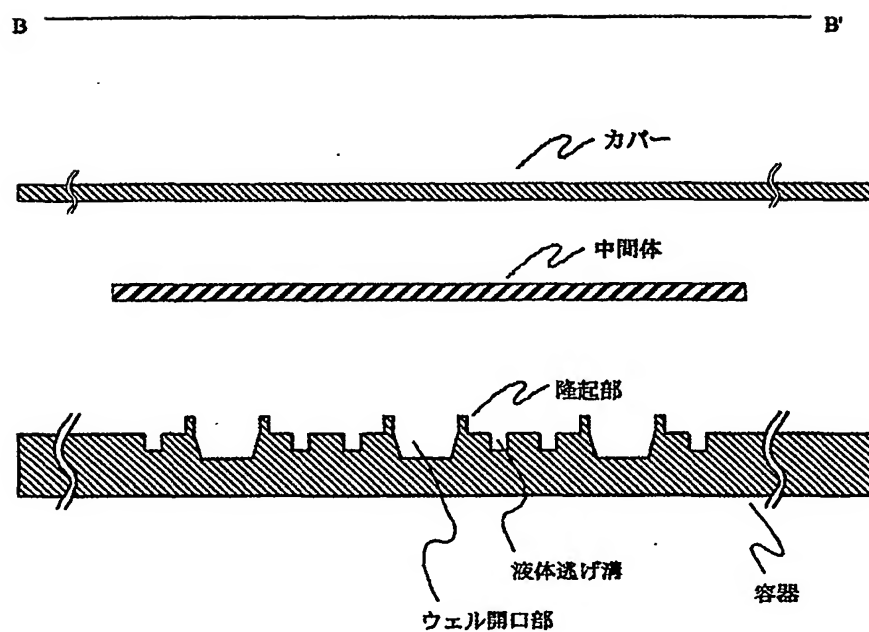


図 17

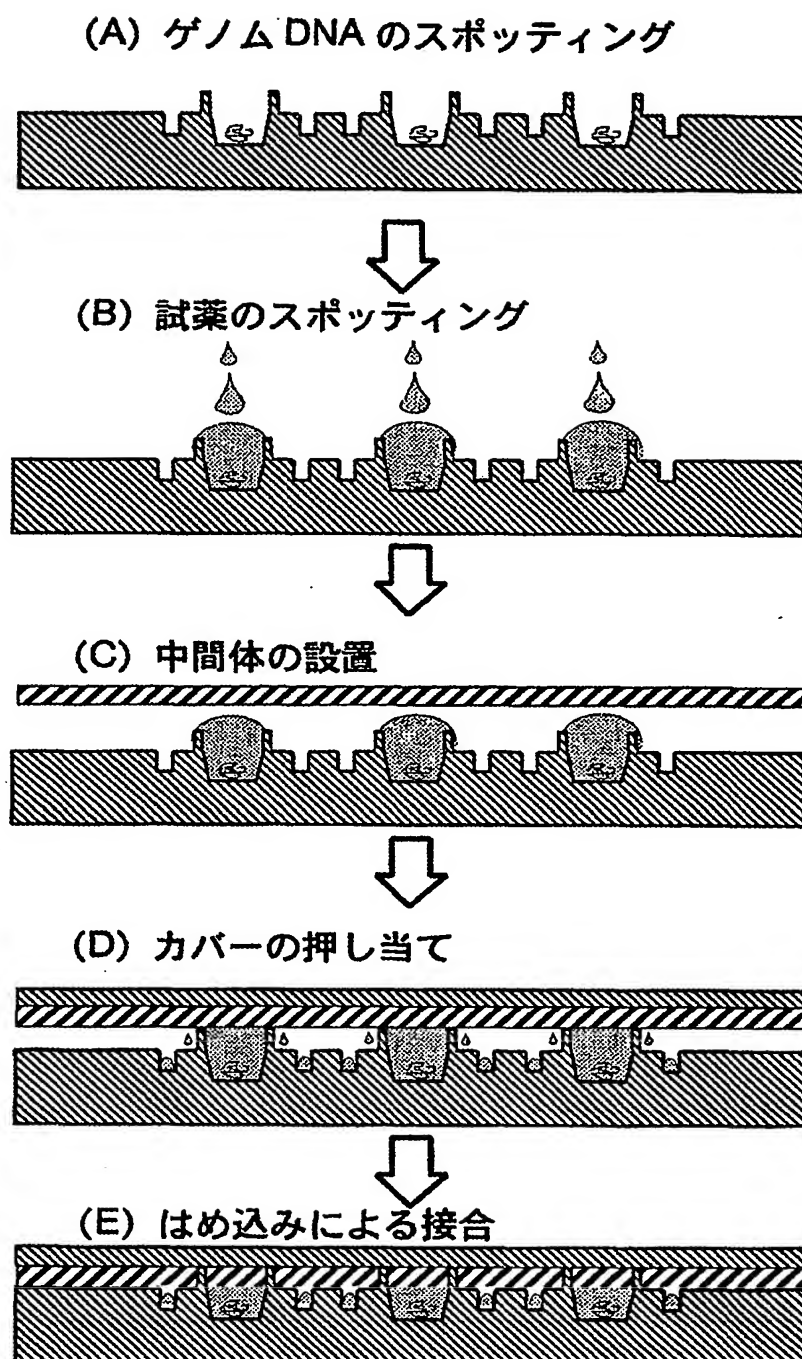


図 18

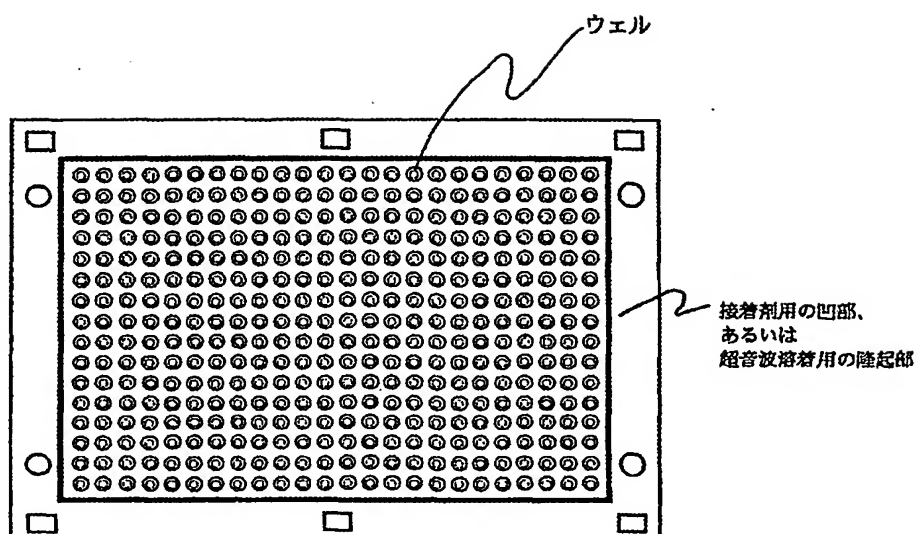
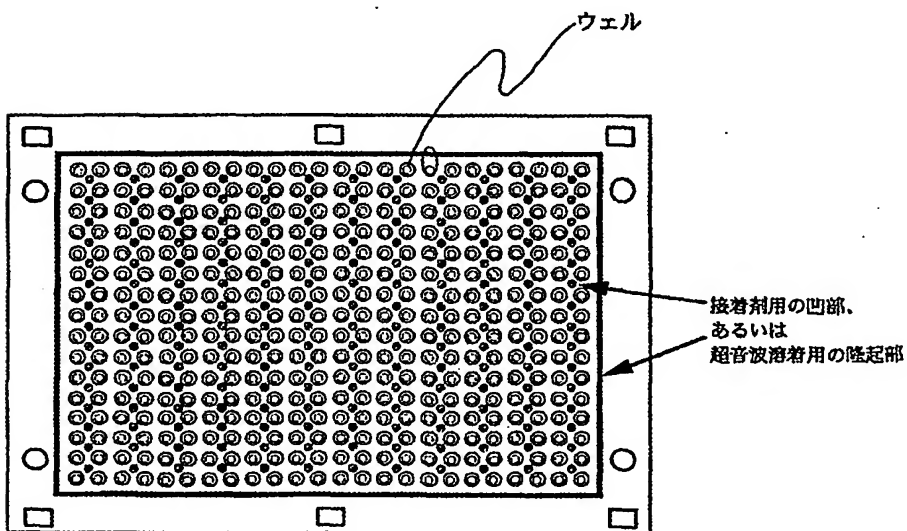


図 19



15/26

図 20

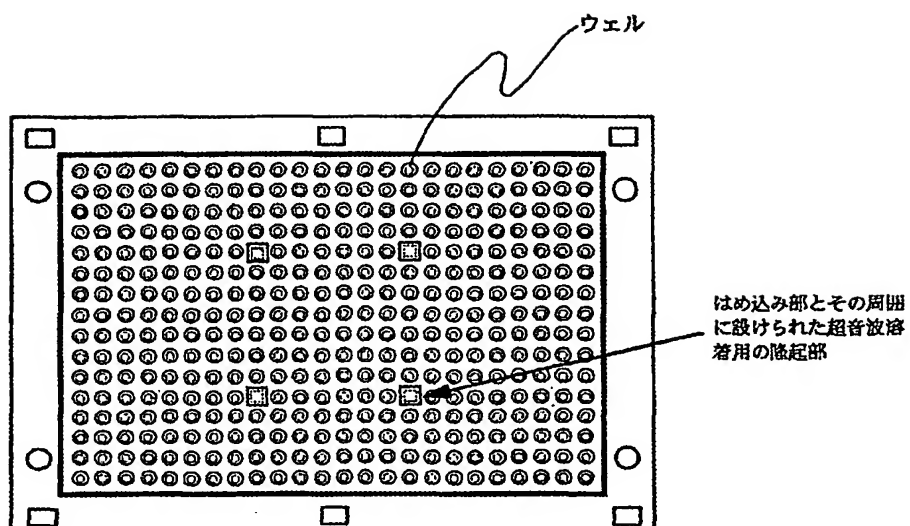


図 2 1

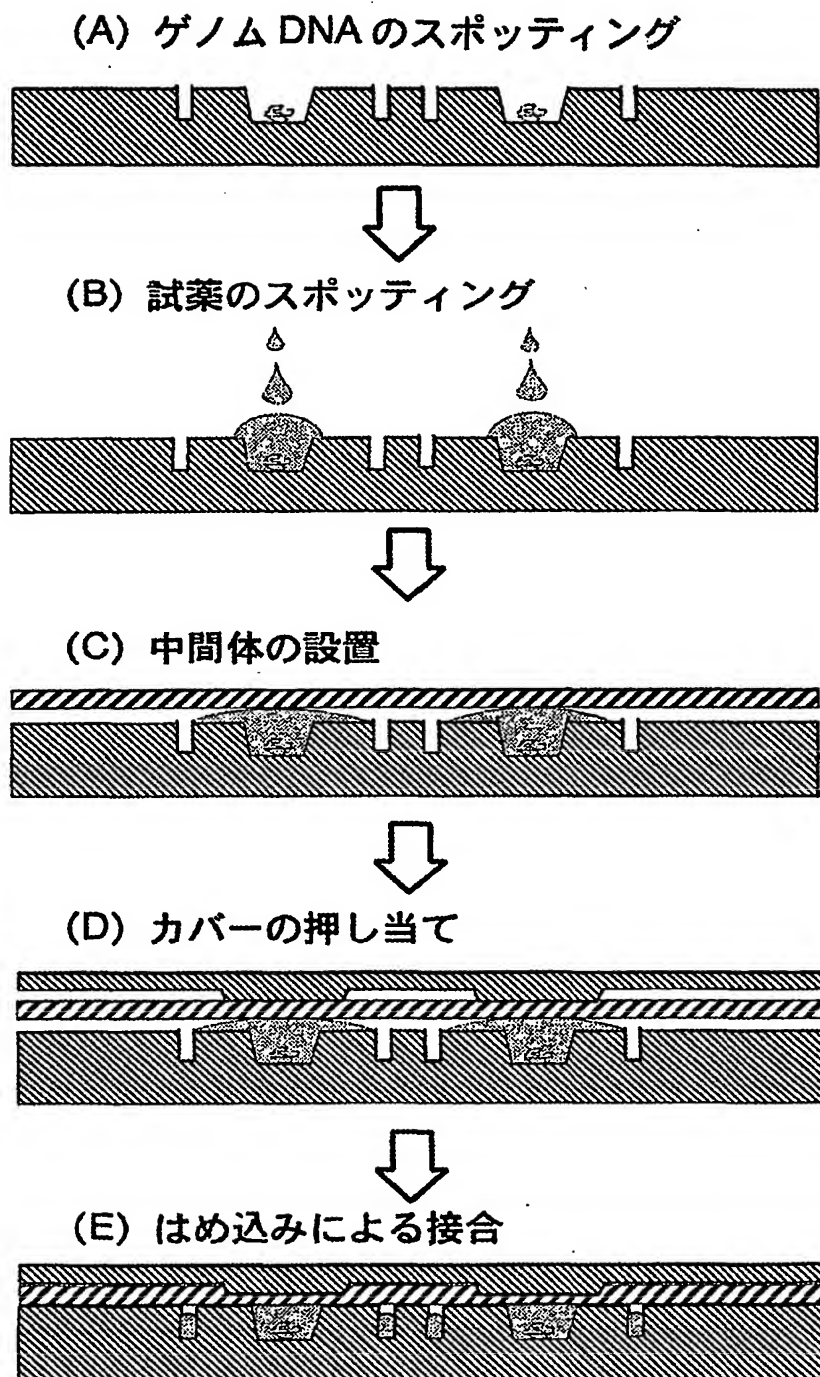


図 2 2

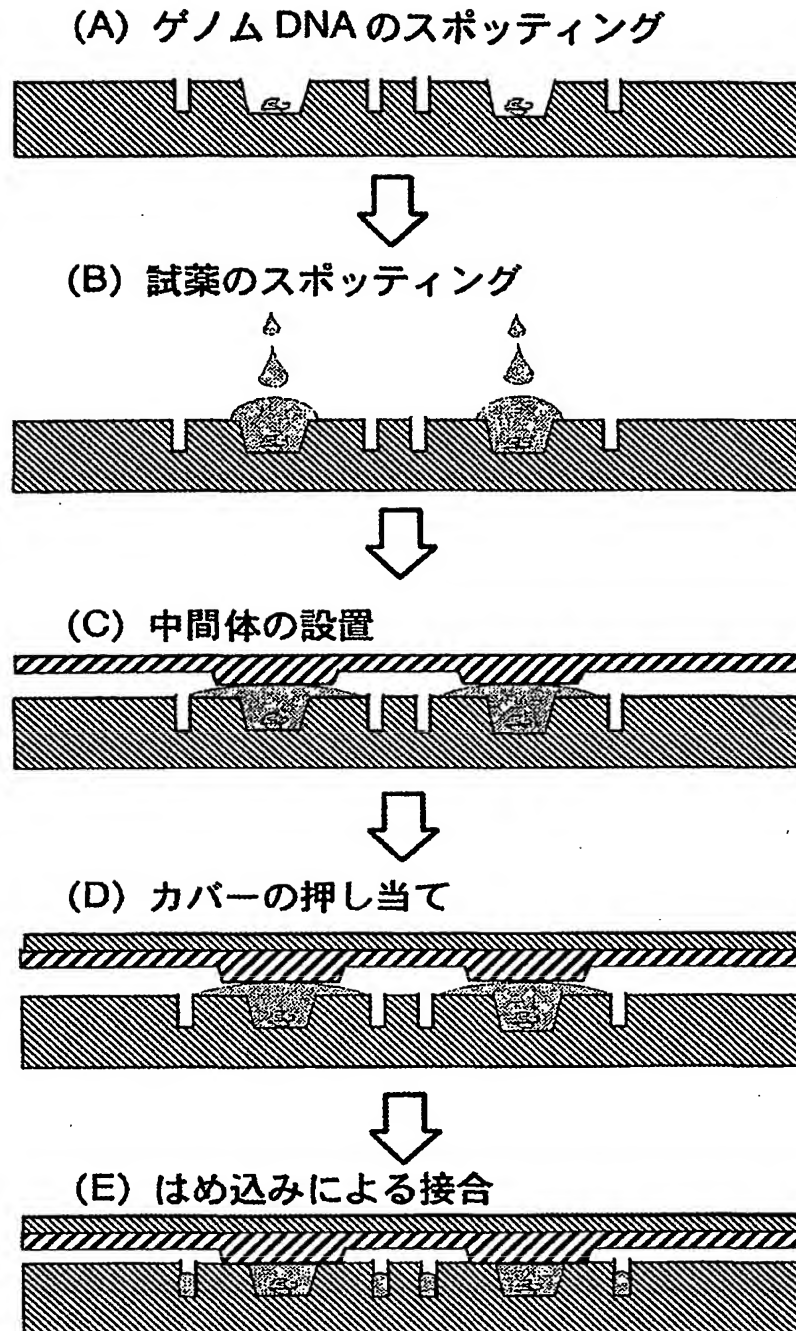


図 2 3

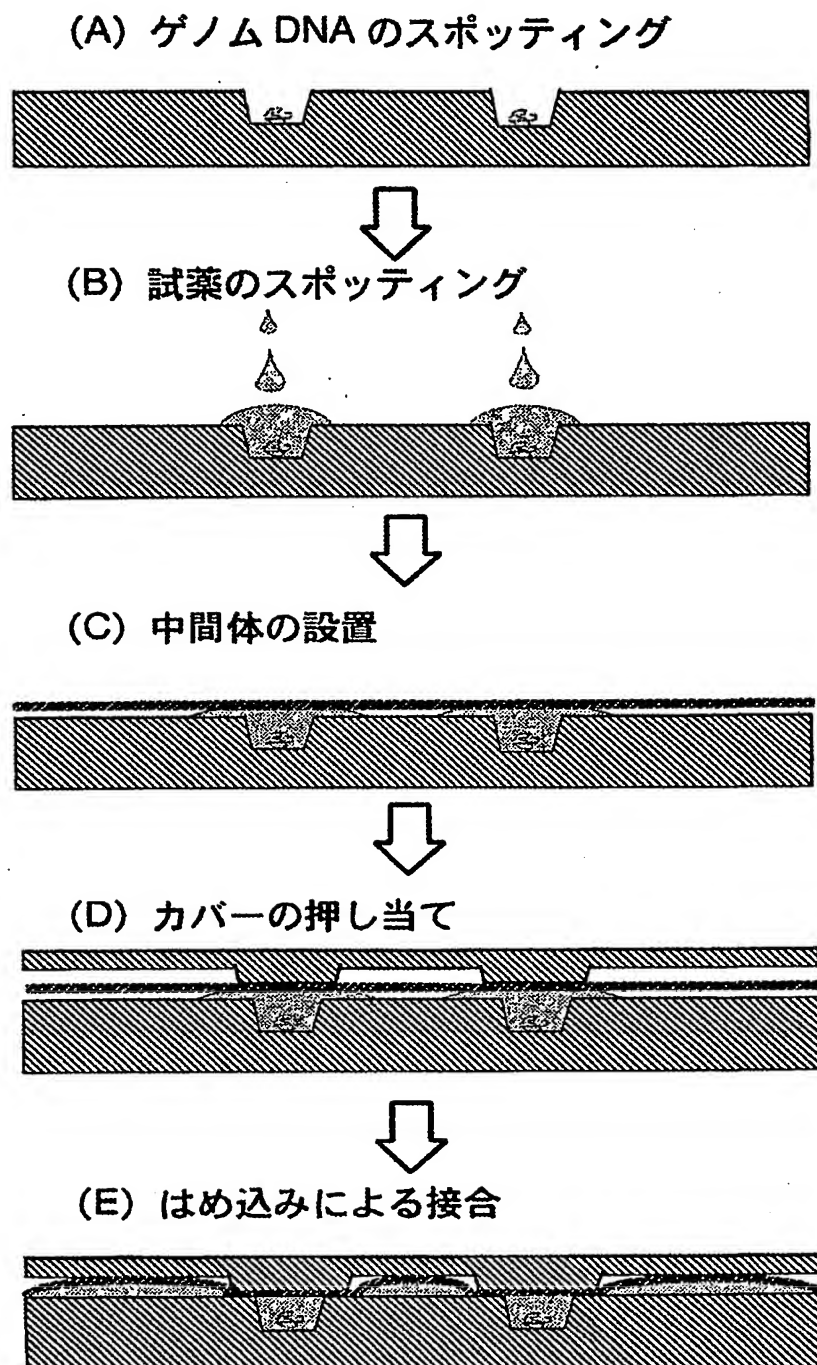


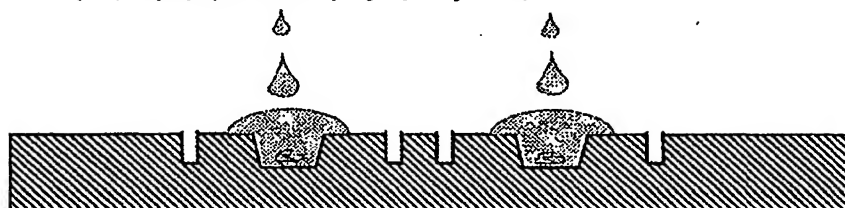


図 2 4

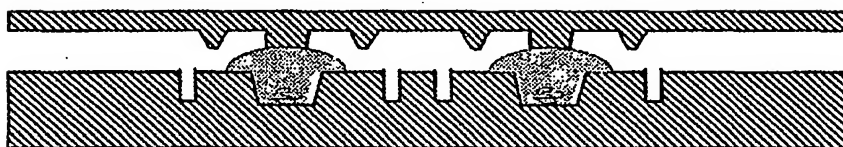
## (A) ゲノム DNA のスポッティング



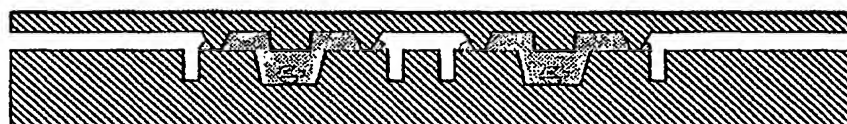
## (B) 試薬のスポッティング



## (C) カバーの設置



## (D) カバーの押し当て



## (E) 超音波溶着



図 2 5

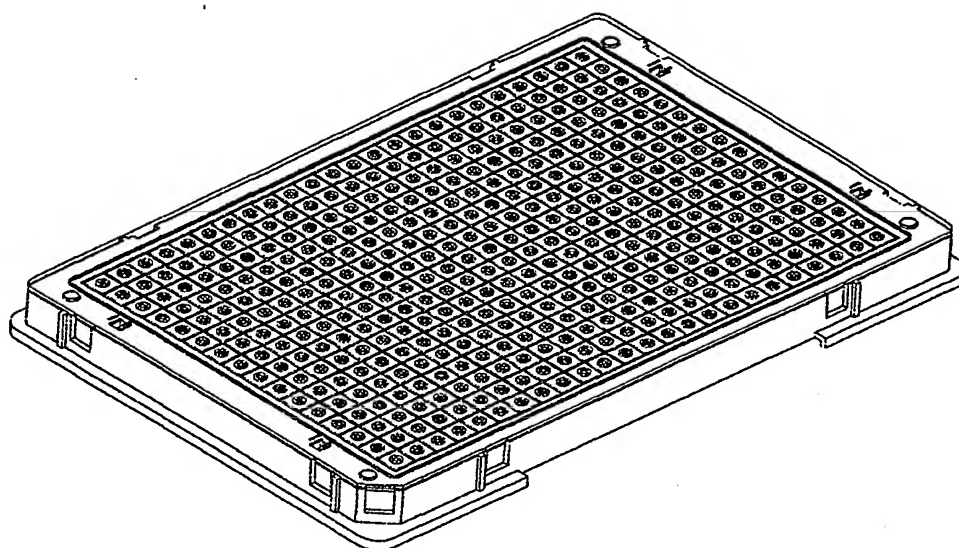


図 2 6

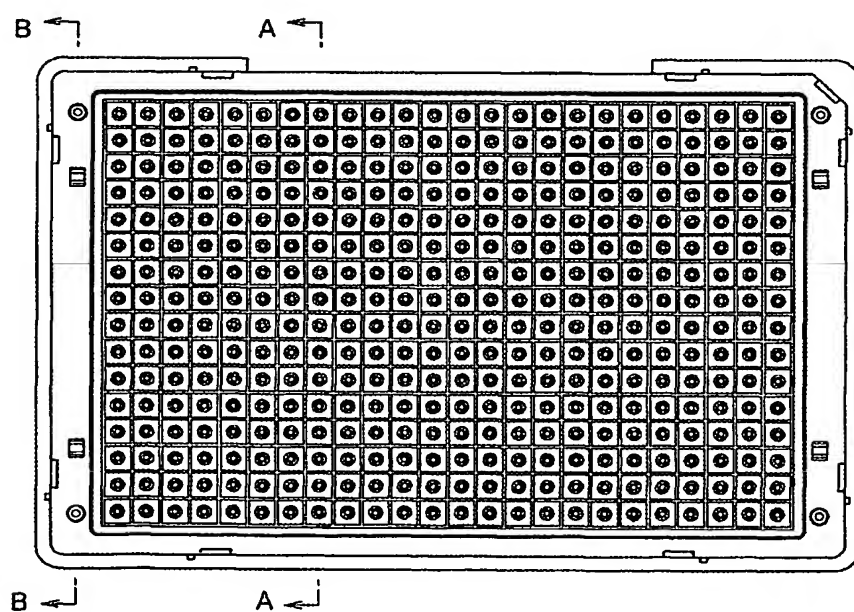


図 27

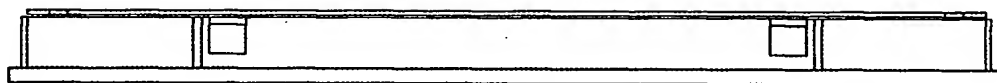


図 28

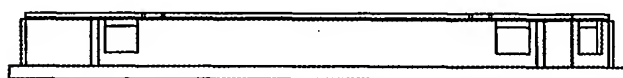


図 29

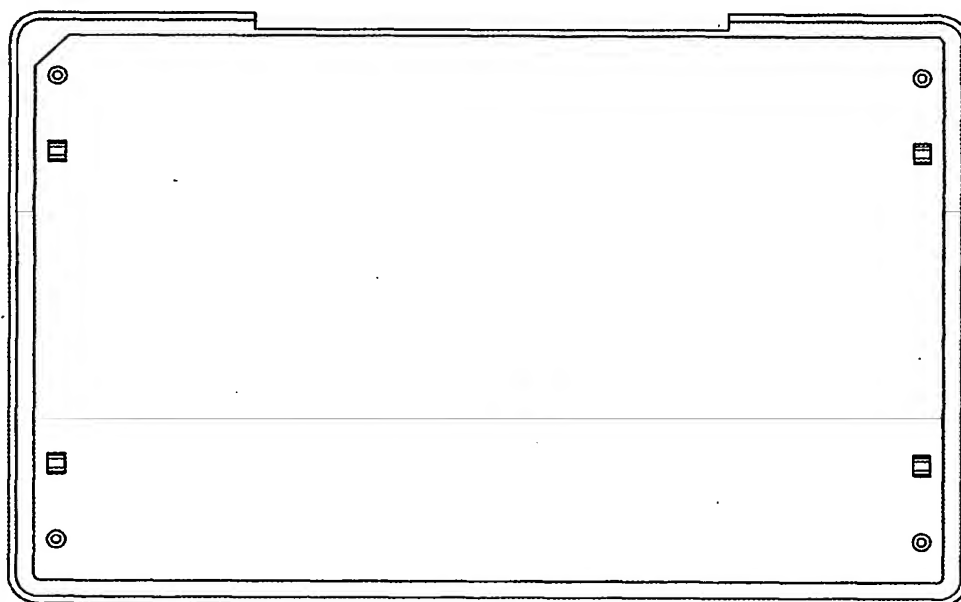


図 3 0

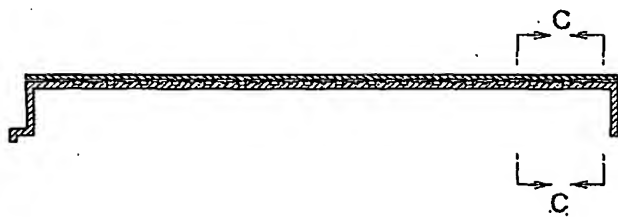


図 3 1



図 3 2

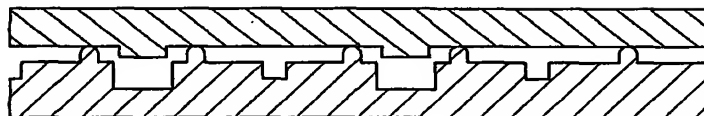


図 3 3

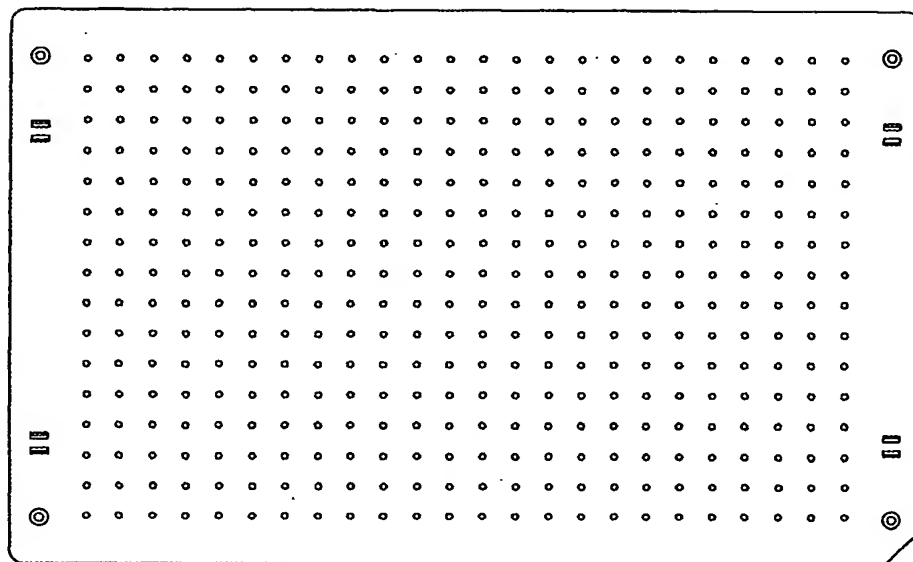
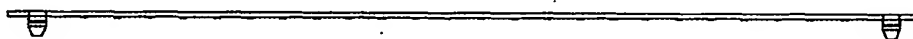


図 3 4



24/26

図 3 5

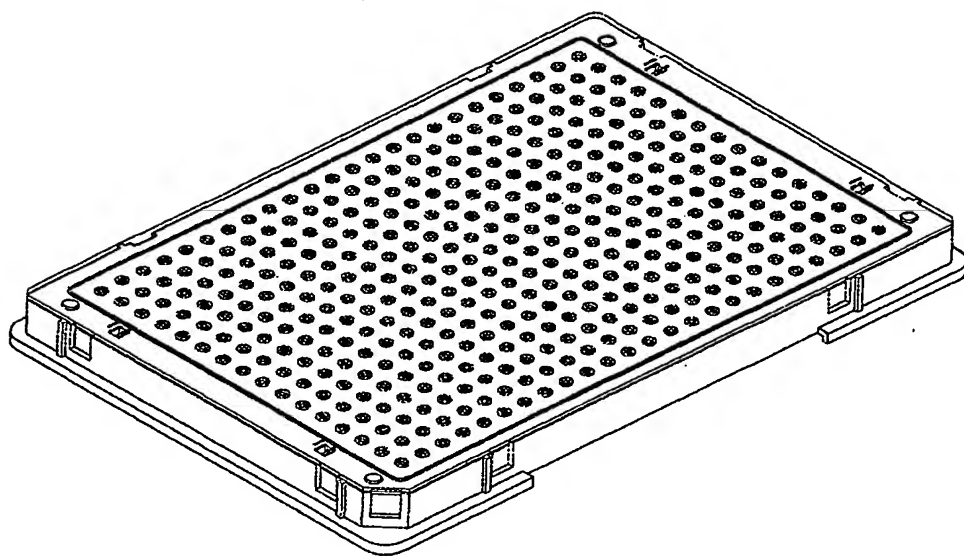
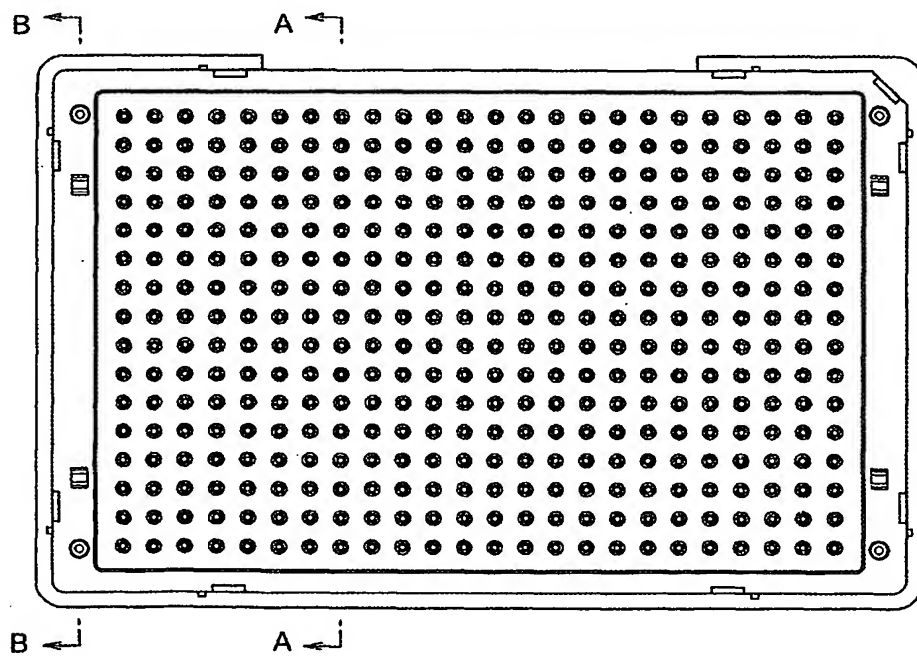


図 3 6



25/26

図 37

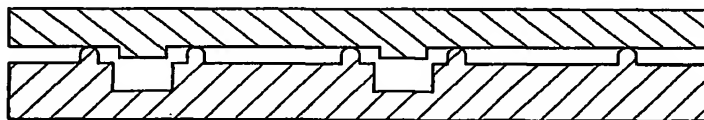


図 38

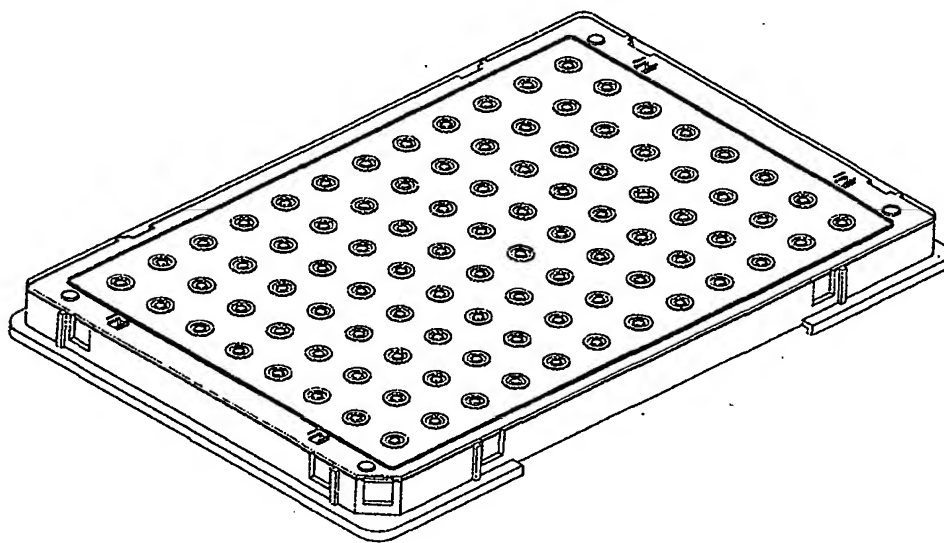
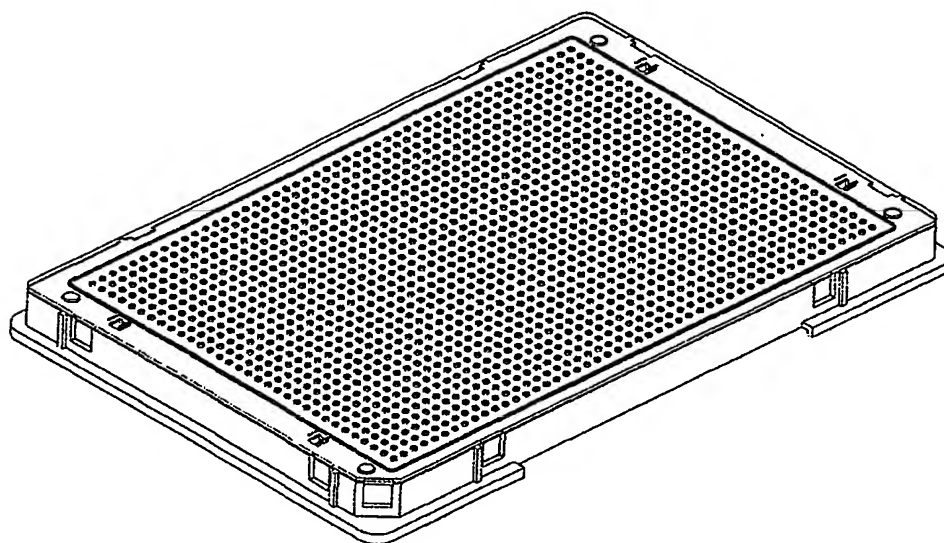


図 39





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08079

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N35/00, G01N37/00, G01N33/48, C12M1/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N35/00-35/10, G01N37/00, G01N33/48-33/98, C12M1/00-1/42, C12Q1/00-1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)  
WPI/L (QUESTEL)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/39481 A (Chiron Corporation), 12 December, 1996 (12.12.96), Full text; Figs. 1 to 10 & US 5604130 A & EP 828560 A & JP 11-507508 A	1-65
A	US 5487872 A (Molecular Device Corporation), 30 January, 1996 (30.01.96), Full text; Figs. 1 to 7 (Family: none)	1-65
A	JP 9-99932 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 15 April, 1997 (15.04.97), Full text; Figs. 1 to 14 (Family: none)	1-65
A	JP 62-195849 A (Japan Storage Battery Co., Ltd.), 28 August, 1987 (28.08.87), Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none)	1-65

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 December, 2001 (10.12.01)

Date of mailing of the international search report  
18 December, 2001 (18.12.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N35/00, G01N37/00, G01N33/48, C12M1/00, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N35/00-35/10, G01N37/00, G01N33/48-33/98, C12M1/00-1/42, C12Q1/00-1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)  
WPI/L (QUESTEL)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 96/39481 A (Chiron Corporation) 12. 12月. 1996 (12. 12. 96) 全文 第1-10図 &US 5604130 A &EP 828560 A &JP 11-507508 A	1-65
A	US 5487872 A (Molecular Device Corporation) 30. 1月. 1996 (30. 01. 96) 全文 第1-7図 (ファミリーなし)	1-65
A	JP 9-99932 A (大日本印刷株式会社) 15. 4月. 1997 (15. 04. 97) 全文 第1-14図 (ファミリーなし)	1-65

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 12. 01

国際調査報告の発送日

18.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高見 重雄



2 J 9116

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 62-195849 A (日本電池株式会社) 28.8月.1987(28.08.87) 全文 第1-2図 (ファミリーなし)	1-65